

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER
LEVENSVERSCHIJNSELEN VAN
WITTE BLOEDLICHAMPJES.

J. DE HAAN.

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER LEVENSVRSCHIJSLEN VAN WITTE BLOEDLICHAMPJES.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN
GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE GRONINGEN,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
A. KLEIN, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE, TEGEN DE BEDENKINGEN
DER FACULTEIT IN HET OPENBAAR TE
VERDEDIGEN OP VRIJDAG 2 JULI 1920, DES
NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

JOHANNES DE HAAN,
GEBOREN TE BAKKEVEEN.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AAN DE NAGEDACHTENIS MIJNER OUDERS.
AAN MIJNE VROUW.

Door verschillende omstandigheden is tusschen het verkrijgen van mijn artsdiploma en het beeindigen van dit proefschrift een aantal jaren verlopen.

Bij deze gelegenheid dank ik U allen, Hooggeleeren en Oud-lector van de Natuurwetenschappelijke en Medische Faculteiten te Groningen voor de leiding mijner academische studie.

U, Hooggeleerde HAMBURGER, Hooggeachte Promotor, betuig ik in het bijzonder mijn diepgevoelde erkentelijkheid voor de groote welwillendheid, die ik niet alleen bij het bewerken van dit proefschrift, maar onder alle omstandigheden, gedurende de reeks van jaren, die ik reeds aan Uw laboratorium verbonden ben, van U heb mogen ondervinden. Het stemt mij tot groote vreugde en dankbaarheid, dat gij, nauwelijks hersteld van Uwe ernstige ziekte, reeds de taak van promotor op U hebt willen nemen.

Ten slotte een woord van dank aan allen, in en buiten het Physiologisch Laboratorium werkzaam, die mij op eenige wijze behulpzaam zijn geweest.



INHOUD.

	Bladz.
INLEIDING	1
HOOFDSTUK I	3*
ONDERZOEKINGEN OVER PHAGOCYTOSE	3
1) Inleidende beschouwingen	3
2) Methodiek der phagocytosebepalingen	8
3) Werking van chloroform op de phagocytose van kool in serum	14
4) Werking van stoffen als Na-propionaat enz. in NaCl 0.9 en in serum	18
5) Het gebruik van amylum als object van phagocytose	24
6) De werking van Na-propionaat vergeleken met die van Calciumzouten, bij gebruik van amylum en kool als object van phagocytose	28
7) Voorloopige conclusies aangaande de oorzaken van phagocytosebevordering	36
8) Verdere phagocytoseproeven met exsudaatleucocyten.	41
a) <i>Methodiek</i>	41
b) <i>Phagocytose door exsudaatleucocyten in verschil-</i> <i>lend milieu; vergelijking met de leucocyten van</i> <i>andere dieren.</i>	48
c) <i>Proeven over de werking, die het milieu op den</i> <i>duur heeft op de mogelijkheid van het tot stand</i> <i>komen van phagocytose</i>	77
HOOFDSTUK II	85
AMOEBOIDE BEWEGELIJKHEID EN PHAGOCYTOSE	85
1) Beschouwing over de krachten, welke beide processen beïnvloeden	85
2) Methoden tot het nagaan van de amoeboide bewe- gelijkheid	93

	Bladz.
3) Verband tusschen amoeboide bewegelijkheid en phagocytose	96
a) invloed van de temperatuur	96
b) Verband tusschen phagocytose en amoeboide bewegelijkheid in verschillend milieu	106
4) Amoeboide bewegelijkheid en phagocytose bij verschillende soorten witte bloedlichaampjes	121
5) Amoeboide bewegelijkheid en emigratie	123
HOOFDSTUK III	134
STOFWISSELINGSVERSCIJNSELEN DER WITTE BLOEDLICHAAMPJES	134
1) Onderzoek over het glycogeengehalte der witte bloedlichaampjes	135
a) De jodophilie der leucocyten	135
b) Micro-methode voor glycogeenbepaling in leucocyten.	144
c) Het glycogeengehalte van exsudaatleucocyten in verschillende omstandigheden	149
d) Glycogeengehalte van bloedleucocyten	163
2) Andere stofwisselingsprocessen en fermentwerkingen in de leucocyten; hun reduceerend vermogen	171
HOOFDSTUK IV	176
DE LEVENSDUUR DER WITTE BLOEDLICHAAMPJES IN VERSCHILLEND MILIEU	176
HOOFDSTUK V	190
IS DE PHAGOCYTOSE TE GEBRUIKEN ALS MAATSTAF TER BEOORDEELING VAN HET AL OF NIET LEVEN DER WITTE BLOEDLICHAAMPJES?	190
HOOFDSTUK VI	202
OVER DEN LEVENSLLOOP DER WITTE BLOEDLICHAAMPJES	202
HOOFDSTUK VII	234
SAMENVATTING	234
Bijlage met microphotographieën	240

INLEIDING.

Het onderzoek, waarvan de resultaten in dit proefschrift zijn neergelegd, baseert op en is de voortzetting van een reeks onderzoekingen, gedurende een aantal jaren in het Physiologisch Laboratorium te Groningen verricht, en waarvan de resultaten in verschillende publicaties zijn meegedeeld ¹⁾. Deze onderzoekingen hadden allen tot doel, den invloed na te gaan, welke de phagocytose ondergaat van verschillende physisch-chemische factoren, en daardoor zoo mogelijk het inzicht in het wezen van het phagocytoseproces te verdiepen. Daar we verder deze phagocytose meenden te mogen beschouwen als een levensuiting der witte bloedlichaampjes, zou* dus een invloed op de mate van phagocytose, natuurlijk onder overigens dezelfde omstandigheden, tot op zekere hoogte beteekenen een invloed op het leven der cel.

In den loop van latere onderzoekingen heeft zich echter onze opinie betreffende het wezen der phagocytose eenigermate gewijzigd, en daarom leek het me gewenscht, de vroeger verkregen resultaten nog eens te toetsen aan deze latere ervaringen, welke vooral door OUWELEEN ²⁾ en door mij zijn verkregen.

¹⁾ Een samenvatting dezer onderzoekingen geeft de monographie van H. J. HAMBURGER: *Physikalisch-Chemische Untersuchungen über Phagozyten*, 1912, uitgegeven bij J. F. BERGMANN te Wiesbaden.

²⁾ Zie hierover J. OUWELEEN: *Over den invloed van serum op de phagocytose*. Diss. Groningen 1915; onder den titel: *Ueber den Einfluss von Serum auf die Phagocytose von Kohle und Amylum**, later verschenen in *Pflüger's Archiv* **164**, **166**, **168** en **169**.

Terwijl ik me hiermee bezig hield, deden zich herhaaldelijk nieuwe gezichtspunten voor, waardoor langzamerhand ook tot op zekere hoogte andere levensverschijnselen der witte bloedlichaampjes, zooals b.v. de amoeboïde bewegelijkheid zonder meer en het glycogeengehalte bij het onderzoek werden betrokken.

Bij de indeeling in hoofdstukken van dit proefschrift was het mijne bedoeling, zooveel mogelijk deze ontwikkelingsgang van het onderzoek op den voet te volgen.

HOOFDSTUK I.

ONDERZOEKINGEN OVER PHAGOCYTOSE.

1. INLEIDENDE BESCHOUWINGEN.

De phagocytose is reeds het onderwerp geweest van zeer omvangrijke onderzoekingen van af het oogenblik, dat METCHNIKOFF wees op de groote rol, die deze functie der witte bloedlichaampjes speelt als verweermiddel van ons lichaam tegen verschillende schadelijke invloeden, in de eerste plaats tegen infecties. Ondanks heftige bestrijding heeft METCHNIKOFF geen enkele concessie van beteekenis aan zijn vele bestrijders gedaan, en handhaafde, al moest hij ook de beteekenis van het milieu voor de leucocytenwerkzaamheid erkennen, tot het laatst zijne meening, dat de mate van phagocytose der bacterien door de witte bloedlichaampjes in laatste instantie de resistentie van het individu tegen infecties bepaalt.

Om deze meening van METCHNIKOFF als aantrekkelijk middelpunt bewegen zich verre de meeste onderzoekingen, over de werkzaamheid der witte bloedlichaampjes verricht. De litteratuur hierover is van zulk een omvang geworden, dat zij niet meer is te overzien.

Het geldt hier de vraag, welke de wederzijdsche verhouding, welke ook de afzonderlijke beteekenis is van de drie factoren, welke bij infectieziekten de hoofdrol spelen, te weten leucocyten en serum aan de zijde der verdediging en bacterien als aanvallers.

Gezien de frappante eigenschap van de bewegelijke lichaamscellen, om zich te kunnen verplaatsen, en daarbij alle mogelijke levende en levenloze voorwerpen in hun protoplasma te kunnen opnemen, is het niet te verwonderen, dat men aan de phagocytose als een integreerende eigenschap van dit soort cellen een belangrijke beteekenis ging toekennen. Geringe phagocytose zou dan een uiting zijn van een minder goede functie van deze cellen. De cel als levend organisme, bezig met het uitoefenen van die functie, wordt dus op het eerste plan geplaatst; al naarmate deze cellen die eigenschap sterker of zwakker hebben, zal de weerstand van het organisme grooter of kleiner zijn. Hierop komt in het kort de leer van METCHNIKOFF en zijne volgers neer.

De school van EHRLICH aan den anderen kant, die de antibacterieele eigenschappen van het serum meer op den voorgrond plaatste, wilde aan de leucocyten slechts een zeer ondergeschikte rol toekennen.

WRIGHT bracht de verbindende schakel tusschen deze twee uitersten: hij toonde aan, dat phagocytose van bacterien eerst mogelijk is bij aanwezigheid van bepaalde serumstoffen, welke zich vasthechten aan de bacterien en zoo als *trait d'union* werkend, de phagocytose mogelijk maken. Hierdoor kwam dus aan het licht, dat een stof de phagocytose kan beïnvloeden, zonder op de leucocyten als zoodanig van invloed te zijn, en bleek dus, dat de uitspraak, dat een cel de eigenschap heeft van phagocytose, slechts in betrekkelijken zin waar is. Deze eigenschap bleek toch afhankelijk van uitwendige invloeden, zonder dat deze de cel zelve aantasten. De phagocytose kon dus gewijzigd worden om zoo te zeggen, buiten de cel om.

Maar juist na WRIGHT's onderzoekingen ging men onderscheiden tusschen de z.n. *spontane phagocytose*, die tot stand

zou komen als zuivere eigenschap van de leucocyten, zonder hulp van omgevende serumstoffen, en de phagocytose met behulp van serum. Men zag, dat de phagocytose van de meeste bacterien niet spontaan gebeurde, dat daarentegen sommige andere (veelal minder virulente) bacterien wel spontane phagocytose te zien gaven, evenals z.n. neutrale levenlooze objecten. De bacterien, gevrijwaard als zij zijn door bepaalde eigenschappen tegen de witte bloedlichaampjes, zouden dus minder geschikt zijn voor het gebruik bij onderzoekingen, welke ten doel hadden, de phagocytose als zuivere eigenschap der leucocyten te bestudeeren.

Nu hadden de bovenbedoelde onderzoekingen onze kennis van de verschillende factoren, die bij de phagocytose van bacterien een rol kunnen spelen, enorm verrijkt, maar tevens het vraagstuk zeer ingewikkeld maakt; waar ze zich, in 't algemeen gesproken, ten doel stelden, de phagocytose zoo nuttig mogelijk te doen zijn tot bestrijding van bacterieele invasies, werd het vraagstuk van de krachten, door welke de phagocytose tot stand komt, meestal slechts zijdelings aangeroerd. De studie dezer krachten zal nu het eenvoudigst zijn daar, waar zij door zoo weinig mogelijk compliceerende factoren wordt bemoeilijkt.

Op dit standpunt baseerden nu de physisch-chemische onderzoekingen, reeds gedurende jaren in dit laboratorium verricht, en in de inleiding aangehaald. Daar de bacterien een wisselenden, niet vooraf te voorspellen en niet te controleeren invloed op de phagocytose uitoefenen, werden deze als proefobject uitgeschakeld, en viel de keuze op een neutraal, levenloos object, waarvan te verwachten viel, dat de invloed altijd constant zou zijn. Fijne houtskool was dit neutrale object. Waar aanvankelijke onderzoekingen verder aangaven, dat voor dit neutrale object de phagocytose in serum en in physiologische (0.9 % ige)

keukenzoutoplossing nagenoeg dezelfde was, werd nu verder in 't algemeen als grondvloeistof NaCl 0.9 genomen, omdat de koolphagocytose in dit medium veel gemakkelijker te bepalen was dan in serum.

De invloed werd nu nagegaan, welke verschillende min of meer ingrijpende wijzigingen van of toevoegingen aan dit milieu op de phagocytose uitoefenden. In het kort samengevat, leverden deze onderzoeken¹⁾ als resultaat op, dat wijzigingen in het oorspronkelijk milieu de phagocytose soms sterk deden teruggaan, soms ook nagenoeg onveranderd lieten, in vele andere gevallen zeer gunstig beïnvloedden. Van de anorganische zouten, welke dienst doen bij de samenstelling van de verschillende z.n. physiologische, kunstmatige vloeistoffen, zooals van RINGER, LOCKE enz., bleek alleen het Ca-ion in staat de phagocytose in NaCl 0.9 zeer te bevorderen; andere positieve en negatieve ionen, welke op de functie van andere cellen (b.v. de hartspiercel) zeer sterk van invloed zijn, bleken voor de phagocytose geen noemenswaarde beteekenis te hebben.

Daarnaast werd gevonden, dat een geheele rij z.n. lipoid-oplosbare stoffen, als jodoform, chloroform e. d., die in sterke concentratie de phagocytose remden, in grootere verdunningen, sterk phagocytosebevorderend werkten; de graad der verdunning bleek voor de verschillende stoffen afhankelijk van hunne relatieve oplosbaarheid in vetten en in water, en volgde in 't algemeen den regel, welke OVERTON voor de narcotische werking dezer stoffen heeft opgesteld.

Van het standpunt bezien, dat de leucocyt is een phagocyteerende cel, welke eigenschap bevordert of verlangzaamd kan worden, was er alle aanleiding om te veronderstellen, dat we

¹⁾ Zie hiervoor wederom H. J. HAMBURGER l.c.

hier te doen hadden met een aantal stoffen, welke in bepaalde concentraties in dezen zin phagocytosebevorderend werkten.

Hiertoe bestond te meer aanleiding, omdat verschillende dezer stoffen (zoals jodoform, campher e. a.) op bepaalde infecties een bekend gunstige werking hebben, welke werking, door hier een bevordering der phagocytose als oorzaak aan te nemen, een gereede verklaring zou vinden.

Ter verklaring van deze bevorderende werking zelf werd nu verder aangenomen, dat zij zou berusten op de oplosbaarheid dezer stoffen in lipoiden; hiervan zou een verweeking van de lipoidrijke buitenste celmembraan het gevolg zijn, waardoor de leucocyt gemakkelijker korreltjes in zich zou kunnen opnemen.

Naarmate het aantal van dergelijke stoffen, die toegevoegd aan NaCl 0.9, phagocytosebevorderend werkten, grooter werd, deed zich meer en meer de behoefte gevoelen, de werking er van ook na te gaan in een milieu, dat nog veel meer physiologisch is te noemen, dan de gebruikte keukenzoutoplossing, n.l. in *serum*.

Voor dit doel onderzocht ik naast chloroform eerst eenige zouten van lagere vetzuren, zoals Na-propionaat, Na-formiaat enz., waarvan was gevonden, dat ze de phagocytose van kool buitengewoon sterk deden toenemen. Op grond van verschijnselen, waarop ik later nog terugkom, werd aangenomen, dat deze werking in verband stond met een vermindering van de oppervlaktespanning van de leucocyt t. o. v. water.

Nu was reeds van te voren te verwachten, dat de aanwezigheid van serum in veel gevallen de werking van toegevoegde stoffen zou wijzigen, en wel in de eerste plaats door zijn z. n. blokwerking, zijn eigenschap om een groot deel der toegevoegde stoffen chemisch of door adsorptie vast te leggen, en daardoor af te trekken van de cel, welke de invloed dezer stoffen zou

moeten ondergaan. In mijne eigen vroegere onderzoekingen was dit reeds gebleken voor chloroform, dat, in serum opgelost, tot zijn oplosbaarheidsgrens nauwelijks toxisch op witte bloedlichaampjes werkt, maar in NaCl 0.9 die toxische eigenschappen in veel grooter verdunningen ontplooit.

Alvorens nu de bovengenoemde onderzoekingen nader te bespreken lijkt het me gewenscht, nog enkele bijzonderheden over de gevolgde methodiek mede te deelen.

2. METHODIEK DER PHAGOCYTOSEBEPALINGEN.

De in het Physiologisch Laboratorium gevolgde methodiek tot het bepalen van de phagocytose van kool door paardeleucocyten is reeds herhaaldelijk beschreven, zoodat het me onnoodig lijkt, deze hier nogmaals volledig te behandelen. Hiervoor meen ik te mogen verwijzen naar het reeds eerder aangehaalde verzamelwerk van HAMBURGER en verder naar de dissertatie van OUWELEEN. Alleen op enkele punten, die vooral aangebrachte wijzigingen betreffen, wil ik hier de aandacht vestigen. Ten eerste wat de bereiding der leucocytensuspensie aangaat: aanvankelijk werd hiervoor paardenbloed opgevangen in een gelijke hoeveelheid van eene oplossing, die 0.9 % NaCl en 0.4 % Natrumcitraat bevatte; met de toevoeging van de laatste stof werd beoogd, om gedurende minstens 24 uur stolling van het bloed te voorkomen. Nu bleek ten eerste, dat de genoemde hoeveelheid Na-citraat voor sommige paarden onvoldoende was, en in de tweede plaats, dat, als men het bloed met zooveel vloeistof verdunde, het zoo gewenschte snelle bezinken der roode bloedlichaampjes vaak uren lang op zich liet wachten. Dit bezinken geschiedt n.l. meestal het snelst in onverdund bloed, en gaat langzamer, naarmate de hoeveelheid NaCl oplossing meer gaat

overwegen. Het gelukte mij n.l. aan te toonen, dat het snelle bezinken der roode bloedlichaampjes bij het paard berust op een sterke geldrollenvorming, welke in NaCl 0.9 verdwijnt. Hoe grooter de geldrollen, hoe sneller de bezinkingssnelheid ¹⁾). Men kan nu het paardenbloed defibrineeren en dan aan zich zelf overlaten; dan bezinken evenwel roode en witte bloedlichaampjes beide zeer snel, zoodat de laatste in hoofdzaak als een dun laagje komen te liggen boven de roode bloedlichaampjes en niet in suspensie blijven. Pipetteert men nu het laagje witte bloedlichaampjes af, dan raken deze onvermijdelijk vermengd met een groot aantal roode.

Toch werd met deze methode eerst gewerkt, en ook een voldoende resultaat verkregen.

Verdunt men nu echter het bloed met NaCl 0.9, waaraan om de stolling tegen te gaan, Na-citraat is toegevoegd, dan vermindert de bezinkingssnelheid van roode en witte bloedlichaampjes beide, die van de witte evenwel zeer sterk, die van de roode niet noemenswaard; daardoor wordt het mogelijk een bovenstaande vloeistof te verkrijgen, die weinig roode en veel witte bloedlichaampjes bevat naast een groot aantal bloedplaatjes. ²⁾)

Ten einde nu eenerzijds de verhinderings der stolling beter te verzekeren, en aan den anderen kant de bezinking der roode bloedlichaampjes zoo snel mogelijk te doen zijn, gebruikte ik bij de latere onderzoekingen een oplossing van 1,1 % Na-citraat in NaCl 0.7 % en ving in 1 deel van deze oplossing 2 à 3 deelen paardenbloed op. Laat men dit mengsel 1 à 2 uur staan (in de warmte is de bezinking sneller dan in de kou, en voor

¹⁾ Zie hierover J. DE HAAN Bioch. Zeitschr. Bd. 86 Hft. 5 en 6 p. 298.

²⁾ Zie E. HEKMA: Biochem. Zeitschr. Bd. 11 (Festband H. J. HAMBURGER) Hft. 1, 2 en 3. p. 177.

verschillende paarden blijft zij verschillend snel), dan kan men een suspensie afpipetteeren die zeer rijk is aan witte bloedlichaampjes, en daarnaast een ongeveer even groot aantal roode bloedlichaampjes bevat. Deze suspensie kan men verscheidene dagen vloeibaar houden; de witte bloedlichaampjes blijven hierin ruim 2 dagen in goeden toestand. Voor het gebruik worden dan door herhaald centrifugeeren de bloedlichaampjes enkele malen met NaCl 0.9 gewasschen. In den aanvang werd hiervoor steeds gebruik gemaakt van een watercentrifuge van laag tourenaantal, ten einde de cellen zoo weinig mogelijk te beschadigen; later bleek, dat ook de gebruikelijke electr. centrifuge van RUNNE met een aantal toeren van ± 3000 per minuut zeer goed nog te gebruiken was, waarbij tijd kon worden bespaard. Na het centrifugeeren werd de bovenstaande vloeistof afgegoten, de leucocyten op den bodem omgeschud, NaCl 0.9 toegevoegd, weer gecentrifugeerd enz.; op deze wijze werd $3 \times$ uitgewasschen, daarna werden de leucocyten op den bodem van de verschillende centrifugebuizen samengevoegd, en zoo met een paar cc. NaCl 0.9 een dikke suspensie verkregen, waarvan nu met een fijne pipet 0.15—0.2 cc. werd toegevoegd aan 3 cc. van de media, waarvan de invloed op de phagocytose zou worden onderzocht. Door contrôle onder het microscoop werd eerst vastgesteld, dat bij de toegevoegde hoeveelheid voldoende en ook niet te veel leucocyten in één gezichtsveld zich bevonden, zoodat telling er van gemakkelijk kon plaats hebben. De leucocyten werden eenigen tijd (deze werd niet bij alle proeven gelijk genomen) aan de media blootgesteld, en daarna kool toegevoegd.

Bij de aanvankelijk gevolgde methode was de doseering van deze kool door middel van een glazen napje te onnauwkeurig; ook werd de kool in substantie toegevoegd, en daarna met de

suspensie geschud, om ze fijn te verdeelen; dit nu is voor het verkrijgen van een gelijkmatige suspensie van kool beslist onvoldoende; ten eerste klontert de kool dan bij aanwezigheid van leucocyten met deze samen; ten tweede kan niet voldoende hard worden geschud, zonder dat men gevaar loopt, de leucocyten te schaden. Daarom werd later anders te werk gegaan; op dezelfde wijze als van de leucocyten werd ook van kool een dikke suspensie gemaakt in NaCl 0.9, en hiervan met een fijne pipet 0.2—0.3 cc. gevoegd bij de verschillende leucocyten-suspensies. De kool zelf was in een achtaamortiertje zóó fijn gewreven, dat er slechts zeer weinig stukjes kool meer waren, grooter dan een wit bloedlichaampje.

De leucocyten-koolsuspensies werden daarop in een broedstoof van 37° C. geplaatst. De buizen, waarin de suspensies zich bevonden, ondergingen in den loop van het onderzoek eveneens wijzigingen. Daar kool betrekkelijk spoedig aan den bodem van het glas kleeft, en ook voor een voortdurende menging van de snel bezinkende bloedlichaampjes, is het gewenscht, de suspensies tijdens hun verblijf in de broedstoof eenige malen voorzichtig te schudden. Bij de langen tijd gebruikte kleine weegglasjes met platten bodem en ingeslepen glazen stop, had dit zijn bezwaren, omdat aan den vlakken bodem de kool sterk kleefde, en bovendien deze fleschjes gemakkelijk braken; ook was het achtereenvolgens schudden van soms 16—20 van dergelijke glaasjes zeer tijdroovend. Daardoor kwam ik er toe te gebruiken vrij dikwandige glazen buizen (wanddikte ongeveer 1 mM.) van ongeveer 15 cc. inhoud, die centrifugeeren desnoods konden verdragen, voorzien van ingeslepen glazen stoppen, welke in een speciaal voor dat doel geconstrueerd rekje in de broedstoof werden geplaatst in een bak met water; door dit laatste werd bereikt, dat de suspensies veel sneller de temperatuur

van 37° C. aannamen. Met het rekje konden nu alle buizen tegelijk worden geschud.

De duur van het verblijf op 37° werd nog al eens gevarieerd, al naar den aard van de proef.

Daarna werden aanvankelijk de suspensies geruimen tijd op een lage temperatuur geplaatst, om verdere phagocytose te beletten; vervolgens werden de buisjes goed omgeschud, in een pipet een weinig suspensie opgezogen, hiervan een paar druppels op een objectglas gedaan, met een groot dekglas afgedekt, en nu met Oc. 4 Obj. E. van ZEISS de telling verricht; meestal bevonden zich per gezichtsveld 20—40 leucocyten. Hierbij deed zich evenwel vaak de moeilijkheid voor, dat onder het dekglas de nog levende leucocyten zich gingen afplatten en uitstrekken, en van onregelmatigen vorm werden, zonder dat men bewegingen van pseudopodien kon zien; hierdoor worden deze cellen doorschijnender en veel minder scherp gecontoureerd, zoodat men ze gemakkelijk over het hoofd ziet (vooral bij kunstlicht) en tevens veel moeilijker valt te constateeren, of er zich kool *op* of *in* het bloedlichaampje bevindt. Om deze moeilijkheid te voorkomen, ging ik er toe over de leucocyten, al of niet na voorafgaande afkoeling (afkoeling is soms gewenscht, om de leucocyten hun ronde vorm te doen hernemen) momentaan te fixeeren door toevoeging van een paar druppels osmiumzuur 1 " „ of formol 10 " „; osmiumzuur geeft mooier fixatiebeelden, maar is voor sterk eiwithoudende milieu's minder aanbevelenswaard, omdat daar een lastig eiwitneerslag zich vormt. Op deze wijze konden de suspensies zonder de zooeven genoemde bezwaren worden onderzocht.

Resumeerende was de methodiek als volgt:

Een hoog cylinderglas, z.n. molglas, wordt voor ongeveer $\frac{1}{3}$ van zijn inhoud gevuld met de citraat-keukenzoutoplossing

(NaCl 0.7 + Na-citraat 1.1 %); hierbij laat men het paardenbloed vloeien, verkregen door venesectie van de halsvena van het paard, tot het glas bijna is gevuld, bedekt alles met een glasplaat, en keert enkele malen voorzichtig om voor een goede menging. Dit citraatbloed blijft 1 à 2 uur staan, tot het bovenste $\frac{2}{3}$ deel, een gele troebele vloeistof zich duidelijk heeft afgegrensd van het onderste $\frac{1}{3}$ deel, dat uit roode bloedlichaampjes bestaat. Nu wordt de bovenste vloeistof afgepipetteerd; voorzover ze direct wordt gebruikt, moet deze suspensie nu worden uitgewasschen; hiervoor worden 4 centrifugebuizen van ± 50 cc. inhoud gevuld, in eene elektrische centrifuge van ± 3000 Touren (F. RUNNE, Heidelberg) gecentrifugeerd gedurende 1 minuut, het citraatplasma afgegoten en tegelijk daarmee het grootste deel der bloedplaatjes, de rest op den bodem omgeschud, tot er niets meer aan den bodem kleeft, en nu de buizen aangevuld met NaCl 0.9 %; deze bewerking wordt nog 2 maal herhaald, daarna na toevoeging van een paar cc. NaCl 0.9 het centrifugaat op den bodem van de verschillende buizen na omschudden bij elkaar gevoegd in één buis; van de zoo verkregen dikke leucocytsuspensie van ± 5 cc. wordt telkens 0.15—0.2 cc. gevoegd bij 3 cc. van de verschillende media in de proefbuisjes.

De media werken korter of langer op de leucocyten in, daarna wordt aan elk buisje 0.2—0.3 cc. van een dikke suspensie van kool in NaCl 0.9 % toegevoegd, ¹⁾ en alles op een temperatuur van 37° C. in water geplaatst in de daarvoor pasklaar gemaakte rekjes; hier wordt elke 5 minuten het geheele toestel een paar maal voorzichtig omgekeerd; na $\frac{1}{2}$ uur of langer wordt de

¹⁾ Bij latere proevenreeksen werd ook van amyllum als object van phagocytose gebruik gemaakt. De gang van het onderzoek werd daarvoor evenwel niet gewijzigd.

inwerking beeindigd, en al of niet na voorafgaande afkoeling worden nu de leucocyten gefixeerd door toevoeging aan elk der buisjes van een paar druppels osmiumzuur 1⁰/₀ of formol 10⁰/₀; ten slotte worden een paar druppels van de suspensie uit een pipet op een objectglas gedaan, en nu onder een groot dekglas de telling verricht.

3. WERKING VAN CHLOROFORM OP DE PHAGOCYTOSE VAN KOOL IN SERUM.

Chloroform-
werking in se-
rum t. o. van die
in NaCl 0.9
enkel verscho-
ven in de rich-
ting van groo-
tere concen-
tratie.

Zooals reeds in de inleidende beschouwing werd opgemerkt gaven de proeven, die ik in deze richting nam, als eerste resultaat, dat de toxische werking van de chloroform in serum veel minder sterk is uitgesproken. Verder bleek in overeenstemming hiermee, dat de bevorderende werking reeds bij een veel sterker concentratie tot uiting komt, dan vroeger in NaCl 0.9⁰/₀ als medium werd gevonden. Schommelde daar de bevorderende werking tusschen concentraties van $\frac{1}{200000}$ — $\frac{1}{500000}$, hier wordt reeds in verdunningen van $\frac{1}{4000}$ — $\frac{1}{10000}$ de phagocytose duidelijk bevorderd.

We vinden dus, dat de chloroformwerking in het serum ten opzichte van die in NaCl 0.9⁰/₀ eenvoudig is verschoven. Ook deze proeven pleiten dus niet tegen de vroeger uitgesproken hypothese, dat de chloroform (in de lijn van OVERTON) een werking uitoefent op de cel, en wel bij zekere concentratie een destrueerende dieptewerking op het celprotoplasma, bij geringere concentraties alleen een oppervlaktewerking op de uitwendige lipoidrijke laag, welke werking de phagocytose in gunstigen zin beïnvloedt. We moeten dan verder aannemen, dat in het serum van de sterkere concentratie chloroform slechts een gering deel mobiel blijft, om zijn werking op de cellen te kun-

nen uitoefenen, en men heeft dus in werkelijkheid, wat deze laatste werking betreft, eigenlijk ook te doen met groote chloroformverduunningen. Op deze wijze opgevat, zouden we dus

TABEL I.

De verschillende oplossingen hebben vooraf $\frac{1}{2}$ uur op de leucocyten ingewerkt.

Vloeistoffen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:		Procentgehalte der leucocyten, welke kool hebben opgenomen. (in verhouding tot het totale aantal getelde witte bloedlichaampjes).
NaCl 0.9	<i>a</i>	$\frac{214}{720} = 29.7 \%$
	<i>b</i>	$\frac{258}{829} = 31.1 \%$
Serum	<i>a</i>	$\frac{346}{1083} = 31.9 \%$
	<i>b</i>	$\frac{200}{576} = 34.7 \%$
NaCl 0.9 + CHCl_3	$\frac{1}{250}$	$\frac{0}{365} = 0 \%$
Serum + CHCl_3	$\frac{1}{250}$	$\frac{0}{345} = 0 \%$
NaCl 0.9 + CHCl_3	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{348} = 0 \%$
Serum + CHCl_3	$\frac{1}{500}$	$\frac{171}{554} = 30.8 \%$
NaCl 0.9 + CHCl_3	$\frac{1}{1000}$	$\frac{5}{497} = 1 \%$
Serum + CHCl_3	$\frac{1}{1000}$	$\frac{268}{790} = 33.9 \%$
NaCl 0.9 + CHCl_3	$\frac{1}{4000}$	$\frac{133}{596} = 22.3 \%$
Serum + CHCl_3	$\frac{1}{4000}$	$\frac{332}{717} = 46.3 \%$

in de verplaatsing van de chloroformwerking op de leucocyten onder invloed van serumcolloïden tot op zekere hoogte een maatstaf hebben voor de mate, waarin deze colloïden de

TABEL II.

De verschillende vloeistoffen hebben $\frac{1}{2}$ uur op de leucocyten ingewerkt.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:		Procentgehalte der leucocyten, welke kool hebben opgenomen:	
Serum	<i>a</i>	$\frac{132}{669}$	$= 19.7 \%$
	<i>b</i>	$\frac{221}{1085}$	$= 20.3 \%$
	<i>c</i>	$\frac{260}{1381}$	$= 18.8 \%$
Serum + CHCl_3 $\frac{1}{1000}$		$\frac{88}{615}$	$= 14.3 \%$
Serum + CHCl_3 $\frac{1}{2000}$	<i>a</i>	$\frac{118}{767}$	$= 15.3 \%$
	<i>b</i>	$\frac{129}{697}$	$= 18.5 \%$
Serum + CHCl_3 $\frac{1}{4000}$	<i>a</i>	$\frac{401}{1470}$	$= 27.2 \%$
	<i>b</i>	$\frac{183}{826}$	$= 22.1 \%$
Serum + CHCl_3 $\frac{1}{10000}$	<i>a</i>	$\frac{331}{1038}$	$= 31.8 \%$
	<i>b</i>	$\frac{319}{1046}$	$= 30.4 \%$
NaCl 0.9		$\frac{134}{397}$	$= 33.7 \%$

chloroform vastleggen. In hoeverre de phagocytosemethode zich leent om quantitatief toxische werkingen vast te stellen, daarop kom ik in een der volgende hoofdstukken nog terug.

De geringere destrueerende werking van de chloroform op de cel in het serum bleek reeds direct bij het microscopisch

TABEL III. ¹⁾

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:		Procentgehalte der leucocyten, welke kool hebben opgenomen:	
NaCl 0.9	<i>a</i>	$\frac{174}{428} = 40.6 \%$	
	<i>b</i>	$\frac{238}{562} = 41.2 \%$	
Chloroform $\frac{1}{20.000}$	<i>a</i>	$\frac{244}{480} = 50.8 \%$	
	<i>b</i>	$\frac{225}{451} = 49.8 \%$	
Chloroform $\frac{1}{100.000}$	<i>a</i>	$\frac{254}{519} = 60.6 \%$	
	<i>b</i>	$\frac{382}{455} = 60.1 \%$	
Chloroform $\frac{1}{500.000}$	<i>a</i>	$\frac{332}{582} = 57 \%$	
	<i>b</i>	$\frac{219}{370} = 59.1 \%$	
Chloroform $\frac{1}{5.000.000}$	<i>a</i>	$\frac{379}{860} = 43.6 \%$	
	<i>b</i>	$\frac{298}{661} = 45 \%$	

onderzoek uit het beeld van de aanwezige roode bloedlichaampjes. In een chloroformconcentratie van $\frac{1}{250}$ vertoonen deze in NaCl 0.9 een volledige haemolyse, niet in serum.

In de tabellen I en II hieronder is de verschillende chloroformwerking in serum en in NaCl 0.9 verduidelijkt; ter vergelijking is verder in tabel III nog eens een vroegere proef weer-

¹⁾ Ontleend aan H. J. HAMBURGER, l. c, p. 144—145.

gegeven, waaruit kan blijken, welke concentraties in NaCl 0.9 bevorderend werken.

In NaCl 0.9 (zie tabel I) werkt de concentratie $1/1000$ nog duidelijk nadeelig op de phagocytose, terwijl in deze concentratie de chloroform in serum de phagocytose duidelijk bevordert; reeds in een concentratie $1/500$ is van een nadeelige werking in serum geen sprake meer.

In tabel II behoudens geringe kwalitatieve verschillen wederom hetzelfde resultaat als in de voorgaande proef. Opvallend is hier de lage phagocytose in serum, veel lager dan in NaCl 0.9 %; op dit verschijnsel kom ik spoedig terug.

4. WERKING VAN STOFFEN ALS Na-PROPIONAAT ENZ. IN NaCl 0.9 EN IN SERUM.

Vroegere onderzoeken¹⁾ hadden aan het licht gebracht, dat de Na-zouten der lagere vetzuren, wanneer men ze toevoegt aan NaCl 0.9 %, de phagocytose van kool door paardeleucocyten ten zeerste bevorderen, en dit binnen zeer ruime concentratiegrenzen, waarvan sommige gelijk staan met sterk hyperisotonische oplossingen. Lag in dit laatste feit reeds een aanwijzing, dat men deze werking van de vetzure zouten waarschijnlijk uit een ander gezichtspunt moet beschouwen dan die van lipoidoplosbare stoffen, zooals chloroform, dit werd nog duidelijker, toen ik ook de invloed naging, die toevoeging van deze stoffen aan serum op de phagocytose uitoefende.

De bevorderende werking van zouten als Na-propionaat op de koolphagocytose blijft in serum uit.

De vervanging van NaCl 0.9 door serum, en ook de toevoeging van een geringe hoeveelheid serum aan NaCl 0.9 had tot

¹⁾ Zie H. J. HAMBURGER en J. DE HAAN, Arch. f. (Anatomie und) Physiologie, 1913, p. 77.

effect, dat nu toevoeging van de zouten der lagere vetzuren de phagocytose absoluut niet meer bevordert. Opmerkelijk is nu verder, dat in tegenstelling met wat we bij de chloroformwerking konden constateeren, hier allerminst kan gesproken worden van een *verschuiving* van de werking in dien zin, dat de werking in serum zwakker tot uiting komt, zooals we zouden mogen verwachten, als een groot deel van het Na-propionaat op de een of andere wijze in het serum werd vastgelegd. Juist een omgekeerde verschuiving is duidelijk aangeduid: terwijl in NaCl 0.9 nog zeer sterke propionaatconcentraties (tot ongeveer 1 %) de phagocytose bevorderen, vinden we bij dezelfde concentratie in het serum een duidelijke teruggang der phagocytose.

Dit laatste verschijnsel laat zich trouwens wel verklaren, omdat de nadeelige werking als gevolg van sterkere concentraties in NaCl 0.9 nog min of meer gecompenseerd wordt door de bevorderende werking van het zout zelf, terwijl in serum deze compensatie uitvalt.

De nu volgende tabellen IV, V, VI en VII geven enkele proeven weer, welke het bovenstaande kunnen verduidelijken.

In de eerste plaats valt in tabel IV weer op, dat serum tegenover NaCl 0.9 duidelijk remmend op de phagocytose werkt. Verder stemmen de cijfers der dubbelproeven niet overal even mooi met elkaar overeen, maar een duidelijke bevorderende werking van Na-propionaat blijkt toch in het minst niet. Nog duidelijker is dit in tabel V, waar in tegenstelling met het bovenstaande serum t.o.v. NaCl 0.9 phagocytosebevorderend werkt, maar toch eveneens de propionaatwerking in serum uitblijft.

In tabel VI en VII komt de verschillende werking van het Na-propionaat (voor tabel VII Na-formiaat) in NaCl 0.9 en in serum tegelijk aan het licht.

TABEL IV

De oplossingen hebben $\frac{1}{2}$ uur op de leucocyten ingewerkt, daarna $\frac{1}{2}$ uur op 37° C.; formolfixatie.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:	Procentgehalte der leucocyten, welke kool hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$a \quad \frac{401}{811} = 49.4 \%$
	$b \quad \frac{235}{538} = 43.6 \%$
Serum	$a \quad \frac{142}{682} = 20.8 \%$
	$b \quad \frac{272}{1089} = 24.9 \%$
Serum + Na-propionaat 2 %	$a \quad \frac{3}{634} = 0.5 \%$
	b
Serum + Na-propionaat 1 %	$a \quad \frac{56}{698} = 8 \%$
	$b \quad \frac{61}{541} = 13.1 \%$
Serum + Na-propionaat 0.4 %	$a \quad \frac{105}{548} = 19.1 \%$
	$b \quad \frac{100}{527} = 18.9 \%$
Serum + Na-propionaat 0.2 %	$a \quad \frac{355}{1159} = 30.6 \%$
	$b \quad \frac{144}{617} = 23.3 \%$

We hebben hier dus vóór ons een eerste voorbeeld van het verschijnsel, dat ook als we een *neutraal object* van phagocytose gebruiken een invloed op de phagocytose niet zoo maar zonder meer kan bestempeld worden als gevolg van een invloed op de leucocyten, maar dat deze werking in elk geval mede afhankelijk is van het gebruikte medium.

TABEL V.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:		Procentgetal der leucocyten, die kool hebben opgenomen:
NaCl 0.9	<i>a</i>	$\frac{59}{399} = 14.7 \%$
	<i>b</i>	$\frac{38}{306} = 12.4 \%$
Serum	<i>a</i>	$\frac{320}{937} = 34.1 \%$
	<i>b</i>	$\frac{590}{1909} = 30.9 \%$
Serum + Na-propionaat 0.2 %	<i>c</i>	$\frac{283}{872} = 32.5 \%$
		$\frac{256}{878} = 29.1 \%$
Serum + Na-propionaat 0.1 %	<i>a</i>	$\frac{519}{1600} = 32.4 \%$
	<i>b</i>	$\frac{248}{743} = 33.3 \%$
Serum + Na-propionaat 0.05 %	<i>c</i>	$\frac{195}{616} = 31.6 \%$
	<i>a</i>	$\frac{280}{876} = 31.9 \%$
	<i>b</i>	$\frac{266}{803} = 33.1 \%$
	<i>c</i>	$\frac{166}{475} = 34.8 \%$

Trouwens, uit de hierboven genoemde tabellen blijkt reeds ook op andere wijze, dat de hypothese, dat we bij *neutrale objecten* een *spontane phagocytose* hebben, en dat het er in dit opzicht weinig toe doet, of we serum dan wel een physiologische NaCl oplossing gebruiken, niet opgaat. Het komt zeer zeker voor, dat in deze beide vloeistoffen gelijke phagocytose wordt waargenomen, maar nog vaker is de phagocytose in

TABEL VI.

De leucocyten hebben een nacht in serumcitraat gestaan; na het uitwasschen werken de verschillende oplossingen $\frac{1}{2}$ uur in; 40 minuten op 37° C., daarna 15 min. afkoelen; formolfixatie.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:	Procentgetal der leucocyten, welke kool hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{117}{511} = 22.8 \%$
NaCl 0.9 + Na prop. 0.4 %	$\frac{261}{536} = 48.6 \%$
NaCl 0.9 + Na prop. 0.2 %	$\frac{247}{488} = 50.6 \%$
<i>a</i>	$\frac{138}{657} = 21 \%$
Serum	$\frac{193}{853} = 22.6 \%$
<i>b</i>	$\frac{148}{703} = 21 \%$
<i>c</i>	$\frac{100}{589} = 16.9 \%$
Serum + Na-propionaat 0.4 %	$\frac{118}{754} = 15.6 \%$
Serum + Na-propionaat 0.2 %	$\frac{136}{708} = 19.2 \%$
<i>a</i>	$\frac{117}{684} = 17.1 \%$
Serum + Na-propionaat 0.1 %	$\frac{269}{1160} = 23.1 \%$
<i>b</i>	$\frac{147}{720} = 20.4 \%$
Serum + Na-propionaat 0.02 %	$\frac{109}{622} = 17.5 \%$
Serum + Na-propionaat 0.01 %	

serum t.o. van die in NaCl 0.9 *sterker* of ook wel *geremd*. Dit verschijnsel is door OUWELLEN ¹⁾ nauwkeurig onderzocht,

¹⁾ Lc.

TABEL VII.

Versche leucocytensuspensie. De verschillende vloeistoffen werken 1 uur in. Verblijf op $37^{\circ} \frac{1}{2}$ uur. Daarna afkoeling gedurende 15 minuten. Fixatie: de NaCl 0.9 preparaten met osmiumzuur, de serumoplossingen met formol.

Vloeistoffen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:		Procentgetal der leucocyten, welke kool hebben opgenomen:
NaCl 0.9	<i>a</i>	$\frac{179}{656} = 27.2 \%$
	<i>b</i>	$\frac{153}{590} = 25.9 \%$
NaCl 0.9 + Na-formiaat	0.4	$\frac{177}{683} = 25.9 \%$
NaCl 0.9 + Na-formiaat	0.2	$\frac{282}{642} = 43.9 \%$
NaCl 0.9 + Na-formiaat	0.1	$\frac{236}{533} = 44.2 \%$
Serum	<i>a</i>	$\frac{265}{565} = 46.9 \%$
	<i>b</i>	$\frac{280}{608} = 46 \%$
Serum + Na-formiaat	1 %	$\frac{13}{590} = 2.2 \%$
Serum + Na-formiaat	0.4 %	$\frac{207}{629} = 32.9 \%$
Serum + Na-formiaat	0.2 %	$\frac{340}{764} = 44.5 \%$
Serum + Na-formiaat	0.1 %	$\frac{303}{691} = 43.8 \%$
Serum + Na-formiaat 0.05 %	<i>a</i>	$\frac{352}{722} = 48.7 \%$
	<i>b</i>	$\frac{349}{738} = 47.2 \%$
Serum + Na-formiaat	0.02 %	$\frac{405}{857} = 47.2 \%$
Serum + Na-formiaat	0.01 %	$\frac{256}{537} = 48 \%$

evenals de *constant remmende invloed* op de phagocytose van kool, welke gevonden wordt, als we verdunningen van NaCl 0.9 in serum in dit opzicht vergelijken met zuivere oplossingen van NaCl 0.9.

In het nu volgende gedeelte zullen we een nog duidelijker voorbeeld van een en ander zien bij het gebruiken van *amylum* als object van phagocytose. We zullen zien, dat hier een *spontane phagocytose* in NaCl 0.9 geheel op den achtergrond treedt, en dat practisch de phagocytose alleen plaats vindt met behulp van *serumstoffen*.

5. HET GEBRUIK VAN AMYLUM ALS OBJECT VAN PHAGOCYTOSE.

Toen ik voor het nagaan van eventueele intra-cellulaire vertering buiten het lichaam zetmeelkorreltjes als object van phagocytose onderzocht, bleek me reeds spoedig, dat de phagocytose hierbij geheel anders verloopt dan we bij kool hebben waargenomen en tevens dat we hier te doen hebben met materiaal, dat zich voor phagocytoseproeven veel beter leent dan kool. Het meest geschikt bleek wel het rijstmeel of *amylum oryzae*, dat uit korreltjes bestaat, die, wat hunne grootte aangaat, nagenoeg alle kunnen worden gefagocyteerd; tamelijk goed bruikbaar voor het doel is ook tarwemeel (*amylum tritici*). Bij het nalezen der litteratuur bleek spoedig, dat ook anderen reeds van zetmeel met succes voor phagocytosedoeleinden hebben gebruik gemaakt. Zoo werden verschillende zetmeelsoorten door HABERLANDT ¹⁾ gebruikt voor het aantoonen van intracellulaire vertering in vivo. Verder bestudeerde O.

¹⁾ L. HABERLANDT: Pflügers Archiv. 132, p. 175-204.

PORGES ¹⁾ met rijstmeel de phagocytose voor cavialeucocyten uit de buikholte afkomstig.

Vorbereidende proeven leerden me reeds, dat in NaCl 0.9 in tegenstelling met het voor kool gevondene nagenoeg elke phagocytose van rijstmeel door paardeleucocyten ontbreekt. Dit is in tegenstelling met wat PORGES vond voor de leucocyten van het Guineesch biggetje, waar in NaCl 0.9 reeds maximale phagocytose was; bij het bespreken van de phagocytose bij andere dieren hoop ik hierop nog terug te komen.

Merkwaardig was nu de bevorderende werking, die optrad, als in plaats van NaCl 0.9 *serum* werd genomen, of niet te sterke verdunningen van serum met NaCl 0.9. Ook deze invloed van serum op amylum is daarop door OUWELEEN ²⁾ meer in bijzonderheden onderzocht.

Van een remmende werking van serumverdunningen, zooals OUWELEEN bij kool constant vond, was hier nooit sprake.

De *doseering* van het amylum liet zich veel gemakkelijker bewerkstelligen dan bij kool. Daar het n.l. steeds in nagenoeg even fijnen vorm aanwezig is, is het mogelijk een standaard-suspensie uit te zoeken van voldoende sterkte om zeker te kunnen wezen, dat voor elke leucocyt enkele korreltjes beschikbaar zijn. Daar mijn leucocytensuspensie ook steeds ongeveer dezelfde was, kon ik hiervoor dus steeds een amyllumsuspensie van de eenmaal vastgestelde sterkte gebruiken. Bij deze vaststelling van den sterktegraad van de amyllumsuspensie bleek, zooals te verwachten was, de groote invloed, die de hoeveelheid voorhanden materiaal heeft op de sterkte der phagocytose. Door het aantal leucocyten in een suspensie te tellen met het

¹⁾ O. PORGES: Zeitschr. f. Immun-forschung. Originale Bd. 2, 1909, p. 5.

²⁾ l.c.

telapparaat van THOMA-ZEISS, en daarnaast op dezelfde wijze het aantal amylumkorreltjes in de toe te voegen amyllumsuspensie, kon ik gemakkelijk combinaties maken, waarbij het aantal leucocyten ongeveer in de volgende verhoudingen stond tot het aantal op te nemen korreltjes: $\frac{4}{1}$, $\frac{2}{1}$, $\frac{1}{1}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ en $\frac{1}{4}$. Als medium werd genomen NaCl 0.9, waaraan $\frac{1}{25}$, dus 4 " " serum was toegevoegd, welke oplossing, zooals reeds vroeger was gebleken, een zeer goede phagocytose te zien gaf.

Vergelijking
tusschen de
telmethode vol-
gens Hambur-
ger en die vol-
gens Wright.

Ik gebruikte deze proef tevens, om de telmethode van HAMBURGER tot het bepalen van de mate van phagocytose te vergelijken met die volgens WRIGHT. Zooals bekend, wordt volgens deze laatste methode de phagocytosegraad uitgedrukt in het aantal korreltjes (bacterien), dat per leucocyt is opgenomen, terwijl HAMBURGER deze uitdrukt in de verhouding, die er bestaat tusschen het aantal witte bloedlichaampjes, dat (een verder onverschillig) aantal korrels heeft opgenomen, en het totale aantal leucocyten. De telling volgens WRIGHT was voor kool niet wel mogelijk, omdat de afzonderlijke stukjes kool niet nauwkeurig zijn afgegrensd. Van amyllum laten zich evenwel de afzonderlijke korrels tamelijk goed tellen. Wanneer nu bij de vergelijking gebleken was, dat de telling volgens WRIGHT veel nauwkeuriger resultaten opleverde op niet te omslachtige wijze, dan zou het overweging verdiend hebben, ten minste voor zoover amyllum betreft, deze laatste methode te gebruiken. De hieronder volgende tabel VIII doet evenwel zien, dat wel is waar de methode van WRIGHT binnen ruimere grenzen bruikbaar is, omdat zij nog verschillen doet zien, als reeds het maximum aantal leucocyten heeft gefagocyteerd, en dus volgens HAMBURGER de mate van phagocytose verder dezelfde zou zijn, maar dat afgezien hiervan beide methoden geheel analoge resultaten geven; en dat de methode van HAMBURGER,

die veel gemakkelijker is, voor alle gevallen kan gebruikt worden, als men slechts de omstandigheden zóó kiest, dat de phagocytose beneden het maximum blijft; door regeling van expositietijd en expositietemperatuur kan dat gemakkelijk worden bewerkstelligd.

TABEL VIII.

Als milieu wordt gebruikt Serum/NaCl 0.9 $\frac{1}{25}$; 30 min. op 37° C.

Verhouding aantal leucocyten: aantal amylnkorrels	Aantal getelde leucocyten	Telling volgens Hamburger			Telling volgens Wright		
		Aantal leucocyten die amyln hebben opgenomen	Phagocytose-procent	Toename der phagocytose in %	Aantal opgenomen rijstkorreltjes	Phagocytaire index	Toename van de phagocytose in %
$\frac{4}{1}$	509	58	11.4	± 90	78	$\frac{78}{509} = 0.15$	± 125
$\frac{2}{1}$	514	111	21.6		175	$\frac{175}{514} = 0.34$	
$\frac{1}{1}$	523	190	38.2	± 75	332	$\frac{332}{523} = 0.63$	± 85
$\frac{1}{2}$	507	262	53.6	± 40	499	$\frac{499}{507} = 0.98$	± 55
$\frac{1}{3}$	507	252	49.7	geen toename	541	$\frac{541}{507} = 1.06$	± 7
$\frac{1}{4}$	508	261	51.3	geen toename	655	$\frac{655}{508} = 1.29$	± 20

We zien uit de tabel tevens de amylnconcentratie, die volgens de telling van HAMBURGER reeds maximumphagocytose geeft, n.l. die, waarbij het aantal amylnkorreltjes dat der leucocyten driemaal—viermaal overtreft. Overeenkomstig hiermee gebruikte ik voor het vervolg steeds als standaardsuspensie een hoeveelheid van 100 mgr. amyln op 10 cc. NaCl 0.9, en voegde

hiervan 0.3 cc. toe aan de oplossingen, of 0.15 cc. als de suspensie was gemaakt met 5 cc. NaCl 0.9.

De afgewogen hoeveelheid amylum werd vooraf tweemaal door centrifugeeren met NaCl 0.9 uitgewasschen.

Na de expositie op 37° C. werd op de gewone wijze gefixeerd met osmiumzuur en formol, en daarna de amylumkorrels duidelijk gemaakt door toevoeging van enkele druppels van een J. J. K.-oplossing; is de onderzochte vloeistof serum of serumhoudend, dan moet men een eenigszins grooter aantal druppels toevoegen, omdat eerst een groote hoeveelheid Jodium door serumstoffen wordt vastgelegd en ontleurd, voordat de amylum kan worden gekleurd.

Het microscopisch beeld wordt door de toevoeging van Jodium bij uitstek fraai en de telling meestal zeer gemakkelijk, zooals uit de aan het slot toegevoegde microphoto's kan blijken. Alleen in onverdund serum treedt meestal een lastige samenklontering der leucocyten op. In het algemeen kan, wanneer met serum als medium gewerkt wordt of met tamelijk geconcentreerde serumverduunningen, volstaan worden met een expositietijd van 15 min. op 37° C.

6. DE WERKING VAN NA-PROPIONAAT VERGELEKEN MET DIE VAN CALCIUMZOUTEN, BIJ GEBRUIK VAN AMYLUM EN KOOL ALS OBJECT VAN PHAGOCYTOSE.

Ik keer nu terug tot de resultaten, die ik verkreeg, toen ik nu ook op amylumphagocytose de invloed naging, uitgeoefend door stoffen als Na-propionaat bij toevoeging zoowel aan NaCl 0.9 als aan serumhoudende vloeistoffen.

Nu bleek, dat *de phagocytose van amylum ook in NaCl 0.9 door toevoeging van zouten als Na-propionaat aan het milieu absoluut niet werd bevorderd*, zooals uit tabel IX ten duidelijkste

Toevoeging van Na-propionaat bevordert de phagocytose van amylum in NaCl 0,9 niet.

blijkt. Deze tabel doet tevens het boven besproken verschil uitkomen, dat er bestaat tusschen de werking van serum op de phagocytose van kool en amylum; beide werden n.l. naast elkaar onderzocht.

TABEL IX.

Vloeistoffen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:	Kool		Amylum	
	Procentgetal der leucocyten, welke kool hebben opgenomen:		Procentgetal der leucocyten, welke amylum hebben opgenomen:	
NaCl 0.9	<i>a</i>	$\frac{228}{676} = 33.7\%$		$\frac{0}{429} = 0\%$
	<i>b</i>	$\frac{179}{517} = 34.6\%$		$\frac{0}{356} = 0\%$
NaCl 0.9 + Na-form. 0.1 %		$\frac{309}{603} = 51.2\%$		$\frac{0}{360} = 0\%$
Serum		$\frac{107}{624} = 17.1\%$		$\frac{274}{374} = 73.2\%$

We kunnen hieruit concludeeren, dat de werking van het Na-formiaat in geen geval alleen op het witte bloedlichaampje wordt uitgeoefend. Immers zoowel de leucocyten als hun milieu zijn precies dezelfde, alleen de op te nemen stof is verschillend, en dit alleen maakt, dat het Na-formiaat bij het object kool wel, bij amylum niet een werking laat zien. Nu zou toch een werking van het zout op de leucocyten nog niet geheel behoeven te worden verworpen, als men slechts aanneemt, dat amylum in een milieu zonder serum in 't geheel niet kan worden opgenomen, dat dus het serum of een bestanddeel er van noodzakelijk als verbindende schakel aanwezig moet zijn, terwijl kool ook zonder dien schakel kan worden opgenomen. In dit geval zou het vetzure zout, gesteld dat

het werkte op de leucocyten, toch bij afwezigheid van serum niet in staat zijn, die werking tot uiting te brengen door een sterkere phagocytose.

Nu kwamen evenwel andere verschijnselen aan het licht, die het onmogelijk maakten, in deze richting met succes door te denken.

Verskil
tusschen de
werking van Na-
propionaat en
Chloorcalcium.

In de eerste plaats bleek, dat de phagocytose van amylum in het milieu NaCl 0.9 niet steeds absoluut nul is, maar soms eenige procenten kan bedragen. Werkte het Na-propionaat alleen door zijn werking op de leucocyten, dan zou in zulke gevallen toch een, zij het geringe, stijging der phagocytose onder invloed van dit zout ook in NaCl 0.9 verwacht mogen worden. Nu heb ik zulk een versterking in een groot aantal proeven eigenlijk nooit duidelijk kunnen constateeren, al moet worden toegegeven, dat in enkele proeven wel eens een geringe vermeerdering scheen aangeduid, te gering evenwel, dan dat daarop eenige conclusies zouden kunnen worden gebouwd. Dit klemte te meer, waar mij nu verder bleek, dat een andere stof, waarvan met eenige waarschijnlijkheid een werking op de leucocyten zou kunnen worden aangenomen, n.l. het *Chloorcalcium*, wel degelijk constant de phagocytose van amylum in NaCl 0.9 bevordert. Deze bevordering is wel is waar betrekkelijk gering na een verblijf van een half uur op 37° C; verlengt men evenwel den expositietijd, dan treedt het verschil in werking tusschen het Na-propionaat en CaCl₂ op de meest frappante wijze aan het licht; waar het Na-propionaat volmaakt zonder invloed blijft, stijgt door de aanwezigheid van chloorcalcium de phagocytose nu in sterke mate.

Ook zou men mogen verwachten, dat het vetzure zout, als het op de leucocyten werkte, ten minste wel de phagocytose van amylum zou bevorderen, als het in plaats van aan NaCl 0.9

wordt toegevoegd aan een verdunning van serum met NaCl 0.9 van zoodanige concentratie, dat hierin een aanmerkelijke phagocytose van amyllum plaats vindt, zooals b.v. meestal in een concentratie van serum $\frac{1}{50}$ het geval is. Ook dan wordt evenwel door toevoeging van Na-propionaat nooit een spoor versterking gevonden, wel daarentegen zeer duidelijk door CaCl_2 .

bevorde-
e werking
Na-propio-
op de kool-
agocytose
dt reeds
toevoeging
n weinig
n aan het
Cl milieu
heven.

Ten slotte bleek een dergelijke toevoeging van een geringe hoeveelheid serum aan het milieu van physiologische keukenzoutoplossing voldoende, om ook elke bevorderende werking van het Na-propionaat op de koolphagocytose te doen verdwijnen, terwijl ook dan het Chloorcalcium bevorderend blijft werken.

In een groot aantal proeven heb ik deze verschillende werkingen kunnen constateeren, hetzij afzonderlijk, hetzij gecombineerd. Zeer frappant illustreert dat tabel X, welke in één proef de volgende feiten aan het licht brengt:

Milieu NaCl 0.9: ruime phagocytose van kool, die nog versterkt wordt zoowel door Na-propionaat als door CaCl_2 ; onbeduidende phagocytose van amyllum, welke nog versterkt wordt door CaCl_2 , niet door Na-propionaat.

Milieu serum 1 op 50 NaCl 0.9: sterk geremde phagocytose van kool; ook hier werkt CaCl_2 nog versterkend, Na-propionaat niet; sterke phagocytose van amyllum, welke door CaCl_2 nog sterk wordt bevorderd, door Na-propionaat in het geheel niet.

In tabel XI is de expositietijd verlengd in een gedeelte der proef, waardoor het verschil tusschen de werking van CaCl_2 en Na-propionaat op de phagocytose van amyllum sterk geaccentueerd wordt.

Tabel XII doet nog eens duidelijk zien, dat toevoeging van een geringe hoeveelheid serum (2%) aan het milieu maakt,

TABEL X.

Versche leucocyten suspensie; inwerking van de verschillende media 35 min.; expositietijd op 37° C. 25 min.; kort durende afkoeling, daarna fixatie in osmiumzuur.

Vloeistoffen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:	Kool		Amylum	
	Procentgehalte der leucocyten, welke kool hebben opgenomen:		Procentgehalte der leucocyten, welke amylum hebben opgenomen:	
NaCl 0.9	$\frac{102}{419}$	$= 24.3 \%$	$\frac{9}{420}$	$= 2.1 \%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.05	$\frac{203}{490}$	$= 41.4 \%$	a $\frac{61}{545}$	$= 11.2 \%$
			b $\frac{34}{266}$	$= 12.7 \%$
NaCl 0.9 + Na-propionaat 0.1	$\frac{176}{453}$	$= 38.8 \%$	a $\frac{10}{485}$	$= 2 \%$
			b $\frac{10}{316}$	$= 3.1 \%$
NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{50}$	a $\frac{53}{565}$	$= 9.3 \%$	$\frac{208}{623}$	$= 33.3 \%$
	b $\frac{34}{414}$	$= 8.8 \%$	$\frac{192}{556}$	$= 34.5 \%$
NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{50}$ + CaCl ₂ 0.05	a $\frac{119}{577}$	$= 20.6 \%$	$\frac{301}{629}$	$= 47.8 \%$
	b $\frac{91}{462}$	$= 19.7 \%$	$\frac{157}{285}$	$= 55.1 \%$
NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{50}$ + Na-prop. 0.1	a $\frac{37}{424}$	$= 8.9 \%$	$\frac{341}{928}$	$= 36.7 \%$
	b $\frac{45}{652}$	$= 6.9 \%$	$\frac{144}{429}$	$= 32 \%$

dat Na-propionaat een remmende werking op de phagocytose ontplooit in sterkere concentraties, welke in zuivere NaCl 0.9 zulks niet doen.

TABEL XI.

Versche leucocyten suspensie. Inwerkingsduur der media 15 min. Verblijf op 37° C. voor de eene helft 30 min., voor de andere helft 1½ uur.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:	Expositietijd op 37° C. ½ uur		Expositietijd op 37° C. 1½ uur	
	Procentgetal der leucocyten, welke amyllum hebben opgenomen:		Procentgetal der leucocyten, welke amyllum hebben opgenomen:	
NaCl 0.9	a	$\frac{8}{394} = 2 \text{ ‰}$		$\frac{17}{248} = 6.8 \text{ ‰}$
	b	$\frac{4}{168} = 2.3 \text{ ‰}$		$\frac{14}{257} = 5.4 \text{ ‰}$
NaCl 0.9 + Na-prop. 0.2 ‰	a	$\frac{6}{383} = 1.5 \text{ ‰}$		$\frac{6}{229} = 2.1 \text{ ‰}$
	b	$\frac{11}{311} = 3.5 \text{ ‰}$		$\frac{11}{275} = 4 \text{ ‰}$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.05	a	$\frac{34}{395} = 8.6 \text{ ‰}$		$\frac{106}{379} = 27.9 \text{ ‰}$
	b	$\frac{21}{231} = 9 \text{ ‰}$		$\frac{80}{282} = 28.3 \text{ ‰}$

Samenvattend kunnen we dus constateeren, dat de zoo duidelijk bevorderende werking van het Na-propionaat alleen tot stand komt, als het milieu gevormd wordt door NaCl 0.9, en dan nog alleen met kool als object van phagocytose.

Er moet dus een groot verschil zijn tusschen kool en amyllum als object van phagocytose, zooals ook reeds blijkt uit de verschillende opname in serum en in NaCl 0.9. Het ligt voor de hand ter verklaring hiervan te denken aan de buitengewoon sterke adsorptie, welke door kool wordt uitgeoefend.

Dat hierop in elk geval voor een deel ook de exclusieve werking van Na-propionaat op de koolphagocytose in NaCl 0.9

TABEL XII.

De suspensie heeft 's nachts in serum-citraat gestaan. Inwerking media 15 min.; 25 min. op 37° C. Afkoeling; formolfixatie.

Vloeistoffen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:	Procentgehalte der leucocyten, welke amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	<i>a</i> $\frac{12}{537} = 2.2\%$
	<i>b</i> $\frac{20}{518} = 3.8\%$
NaCl 0.9 + Na-prop. 0.2	$\frac{35}{568} = 6.1\%$
„ „ + „ 0.1	$\frac{22}{543} = 4\%$
„ „ + „ 0.05	$\frac{23}{409} = 5.6\%$
NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{50}$	<i>a</i> $\frac{395}{832} = 47.4\%$
	<i>b</i> $\frac{415}{795} = 52.2\%$
NaCl 0.9 +	$\frac{281}{855} = 32.9\%$
	$\frac{321}{639} = 50.2\%$
	$\frac{251}{530} = 49.2\%$

berust, bleek me, toen ik amylum zóódanig ging veranderen, dat het evenals kool in NaCl 0.9 spontaan wordt opgenomen. Dit gelukte me, door amylum vooraf te schudden met serum, en vervolgens de serumresten te verwijderen, door eenige malen uit te wasschen met NaCl 0.9. Amylum, dat op dergelijke wijze is voorbereid, geeft ook in physiologische keukenzout-

oplossing een matig sterke phagocytose. *Op de phagocytose van deze voorbehandelde amyllum nu in NaCl 0.9 oefende toevoeging van de gewone hoeveelheid Na-propionaat een duidelijk bevorderende werking uit, zooals tabel XIII doet zien.*

TABEL XIII.

Leucocyten hebben 's nachts in serumcitraat gestaan. Verblijf op 37° C. 30 min. Formolfixatie. Amyllum voorbehandeld, door het 45 min. met paarde-serum op 37° C. te behandelen, en daarna viermaal uit te wasschen met NaCl 0.9⁰/₀.

Vloeistoffen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:	Kool	Amyllum	Amyllum, voorbehandeld met serum
	Procentgetal leucocyten, welke kool hebben opgenomen:	Procentgetal leucocyten, welke amyllum hebben opgenomen:	Procentgetal leucocyten, welke voorbehandeld amyllum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{201}{535} = 37,5\%$	$\frac{12}{483} = 2,4\%$	$\frac{321}{949} = 33,8\%$
NaCl 0.9 + Na-propion. 0.2	$\frac{248}{339} = 72,5\%$	$\frac{11}{384} = 2,8\%$	$\frac{523}{1015} = 51,5\%$

Vergelijken we hiermee de totale onwerkzaamheid van het Na-propionaat, zoodra een slechts geringe hoeveelheid serum aan het milieu zelf wordt toegevoegd (zie tabel X), dan komen we tot de conclusie, dat de werking der vetzure zouten alleen in een serumvrij milieu goed tot uiting komt. Zij is dus niet geheel te verklaren, door eenvoudig een werking van het zout op de leucocyten aan te nemen, maar is eenigermate een uitzonderingsgeval, dat zich alleen voordoet bij de toevallige combinatie NaCl 0.9, kool en leucocyt. Eenmaal deze combinatie gegeven, komt een buitengewoon groote en constante versterking der phagocytose tot in zeer hooge concentraties van

het Na-propionaat tot uiting; door een geringe wijziging evenwel van het milieu, of door verandering van het object der phagocytose blijft hiervan niets over.

7. VOORLOOPIGE CONCLUSIES AANGAANDE DE OORZAKEN VAN PHAGOCYTOSEBEVORDERING.

Al de voorafgaande proeven geven per slot van rekening geen nauwkeurig inzicht in het juiste aangrijpingspunt van de propionaatwerking. Pogingen, om hierin dieper door te dringen, hebben mij zeer lang opgehouden, en zijn ten slotte niet geslaagd. Hoogstwaarschijnlijk is hier ook geen sprake van een eenvoudige werking, maar is deze zeer ingewikkeld, zooals dit bij een ingewikkeld proces, als de phagocytose zelf is, ook verwacht kan worden.

Wel leiden mijn proeven noodzakelijkerwijze tot de gevolgtrekking, *dat een sterkere of zwakkere phagocytose niet behoeft samen te gaan met z.n. gunstigere of ongunstigere levensverhoudingen van het witte bloedlichaampje*. Wanneer we n.l. zien, dat leucocyten kool tamelijk sterk opnemen in een milieu als physiologische keukenzoutoplossing, en in veel mindere mate in serum, verdund met NaCl 0.9, terwijl toch dit laatste voor het leven van den leucocyt zeer zeker gunstiger moet zijn, dan een zuivere keukenzoutoplossing, dan volgt hieruit de bovenstaande conclusie zonder meer. In dezelfde richting wijst de zeer verschillende werking van eenzelfde milieu op de phagocytose, al naarmate kool of amyllum moet worden opgenomen: een serumverdunding van b.v. $\frac{1}{10}$ doet amyllum maximaal opnemen en daarnaast de phagocytose van kool tot een minimum dalen; Na-propionaat, toegevoegd aan physiologische keukenzoutoplossing, bevordert de opname van kool, niet die van amyllum.

Het begrip *bevordering der phagocytose* is dus iets zeer betrekkelijks; alvorens uit een sterkere phagocytose iets te kunnen concludeeren, moeten we rekening houden met een groot aantal factoren, en in dit opzicht blijken z.n. „*neutrale objecten*” zeker weinig minder ingewikkeld, dan levende zooals bacteriën: bevorderende en remmende stoffen spelen ook hier een rol¹⁾.

ten, welke
r het tot
komen
phagocytose
zaam zijn.

Nu is het ook eigenlijk niet te verwonderen, dat het niet wel mogelijk is, het phagocytoseproces op eenvoudiger basis te plaatsen, als we de krachten beschouwen, welker samenwerking ten slotte de phagocytose moet tot stand brengen; of we dan met bacteriën of met neutrale objecten te doen hebben, de aard dezer krachten blijft per slot van rekening dezelfde. Immers met RHUMBLER²⁾ kunnen we aannemen, dat bij het tot stand komen van de phagocytose physische invloeden de hoofdrol spelen. Zal het mogelijk zijn, dat de vloeistofdruppel, die het witte bloedlichaampje dan toch is, een vast of vloeibaar deeltje uit de omgevende vloeistof in zich opneemt, dan moet er een bepaalde verhouding zijn in de onderlinge oppervlaktetenspanningen van de drie in aanmerking komende lichamen, te weten van den leucocyt, de omgevende vloeistof en het op te nemen voorwerp; als hieruit een kracht resulteert, die het voorwerp in den leucocyt drijft, dan alleen heeft opname plaats. Zooals bekend is, heeft RHUMBLER de phagocytose door levenlooze voorwerpen kunnen nabootsen met een chloroformdruppel, welke in water als milieu prompt een schellakdraad in zich opneemt.

Wanneer we ons zuiver aan deze krachtenwerking houden, kunnen we ons dus zeer goed een phagocytose voorstellen, waarbij levensverschijnselen der cel buiten beschouwing blijven;

1) Zie voor de uitvoerige uiteenzetting hierover: OUWELEEN I. c.

2) Zie o. a. de samenvatting in „Ergebnisse Physiologie”, 1914.

we kunnen ons een bevordering der phagocytose denken door invloeden, welke voor het leven der cel desnoods nadeelig zijn, en aan den anderen kant een teruggang van het opnamevermogen, zonder dat de cel beschadigd wordt, als slechts in de een of andere zin een werking op deze oppervlakteverhoudingen tot uiting komt. De bovengenoemde voorbeelden, ontleend aan mijne eigen proeven, zijn van deze mogelijkheden een frappant voorbeeld. Gegeven het zeer ingewikkelde van het proces met een aantal wisselende factoren, zal het echter steeds zeer moeilijk zijn, uit te maken, waar precies het aangrijppingspunt is van de stof, waarvan de werking op de phagocytose wordt onderzocht, en meestal zal deze werking ook niet enkelvoudig zijn, maar gelijktijdig op verschillende factoren zijn invloed doen gelden. Nemen we b.v. de werking van Na-propionaat, toegevoegd aan physiologische keukenzoutoplossing. Is kool het op te nemen voorwerp, dan heeft door het Na-propionaat een zoodanige wijziging in de verhouding der verschillende oppervlaktetenspanningen plaats, dat de opname van kool in de leucocyten wordt versterkt; bij amyllum blijft dit verschijnsel uit.

We zien dus, dat de mate van phagocytose buiten het lichaam kan stijgen en dalen als 't ware buiten het leven der cel om; de levensverhoudingen der cel schijnen daarmee niet noodzakelijkerwijze gemoeid te zijn. RHUMBLER gaat zelfs zoover te zeggen, dat men zeer goed de mogelijkheid aan kan nemen, dat doode cellen eveneens wel zullen kunnen opnemen, wat hij voor eencelligen dan ook herhaaldelijk heeft kunnen constateeren. Theoretisch is dit evenwel alleen mogelijk, zoo lang ook de doode cel een vloeibare aggregaatstoestand behoudt. Nu verandert evenwel meestal met den dood de toestand van het protoplasma in dien zin, dat daardoor alleen reeds verdere phagocytose onmogelijk wordt.

Op deze wijze beschouwd, lijkt de phagocytose wel eenigszins af te dalen tot een functie van minder gewicht, een gevolg van toevallige spelingen van oppervlaktespanningen; men raakt tot dergelijke conclusies onwillekeurig geneigd, als men in vitro de zeer sterke wisselingen in phagocytose bij gelijke cellen te zien krijgt, zooals o. a. bij mijne proeven het geval is.

Ook in deze richting moet men evenwel weer niet te ver gaan; men zou dan geen recht doen aan de ongetwijfeld zeer belangrijke beteekenis, die de phagocytose heeft voor de voeding van de eencelligen. De levende amoebe kan selectief voorwerpen al of niet opnemen, de doode cel kan dit niet meer. Ook dit is zeer goed te verklaren, ook al beschouwen we de handeling der phagocytose eenvoudig als een resultante van krachten. Immers het levende protoplasma ondergaat bij zijn stofwisseling voortdurend wisselingen, die zeer zeker ook de oppervlaktespanningsverhoudingen van de cel tegenover de omgeving, en daarmee de phagocytosemogelijkheden zullen wijzigen. De levende cel staat dus tegenover het phagocytoseproces als een factor, die zich zelf kan wijzigen; zij is dus in dit opzicht niet geheel het slachtoffer van haar omgeving, en het is zeer goed mogelijk, dat die stofwisselingsprocessen de cel in staat stellen, in zekeren zin een keuze te doen uit datgene, wat in de omgeving ter opname aanwezig is. Men behoeft daarvoor slechts aan te nemen, dat stofwisselingsprocessen, dus protoplasmaveranderingen, onder invloed staan van en in zekeren zin gericht worden door bepaalde factoren in de omgeving.

Op deze wijze kan men zich denken dat onder invloed van bacterien en hunne stofwisselingsproducten de stofwisseling der cel ook in een bepaalde richting wordt geleid, die voor de phagocytose gunstig of ongunstig is. Aan den anderen kant is het waarschijnlijk dat bij de amoeboide cellen van de

hoogere dieren, die een uitgesproken massawerking vertoonen, de phagocytose minder actief zal zijn dan bij de vrijlevende eencelligen; immers bij de eerste is phagocytose voor voedingsdoeleinden niet noodig.

Op de hier even aangestipte zaken, die ten slotte het essentieele van het leven der cel raken, hoop ik naderhand nog terug te komen. Met de voorloopige aanduiding er van bedoelde ik te doen zien, dat het vraagstuk der *bevordering* en der *benadeeling* van de phagocytose zeer ingewikkeld is. *Teruggang* der phagocytose is mogelijk, terwijl de cel zelf rustig doorleeft (bijv. bij inactivering van serum), maar kan ook de uiting zijn van den dood der cel.

Bevordering der phagocytose kan buiten de cel omgaan, maar is eveneens denkbaar als een invloed in een bepaalde richting op het leven der cel.

Een gecombineerde werking zal veelal plaats vinden, omdat oppervlaktewerkingen in elk geval op den duur meestal ook het inwendige leven der cel zullen wijzigen.

Men moet hiermee rekening houden, als men de phagocytose zou willen gebruiken voor het vaststellen van den graad van toxiciteit van bepaalde stoffen. De bepaling van de phagocytose lijkt tot dit doel zeer geschikt, maar men zal dan toch rekening moeten houden met de mogelijkheid, dat een stof de phagocytose verlamt zonder de cel zelve aan te tasten; dit is uit te maken door de cellen na de inwerking der stof terug te brengen in een milieu, waarin de levende cel constant sterk phagocyteert. Aan den anderen kant moet de mogelijkheid onder 't oog worden gezien, dat een stof de cel doodt, en toch phagocytose mogelijk blijkt, omdat de cel vloeibaar is gebleven.

8. VERDERE PHAGOCYTOSEPROEVEN MET EXSUDAATLEUCOCYTEN.

a) Methodiek.

Waar het vraagstuk zoo ingewikkeld is, leek het me gewenscht, het verband, dat er bestaat tusschen de levensomstandigheden van de cel en de mate van phagocytose, zoo mogelijk nauwkeuriger na te gaan en te onderzoeken, welken invloed verschillende omgevende vloeistoffen hebben op dit leven zoowel als op de phagocytose.

Ik achtte het wenschelijk, me daarbij niet alleen te bepalen tot de bloedlichaampjes van het paard, maar liefst ook die van andere dieren in het onderzoek te betrekken. Nu is het zeer bezwaarlijk, van andere dieren dan het paard de witte bloedlichaampjes direct uit het bloed te verkrijgen. Alleen bij het varken zijn de verhoudingen eenigermate zoo, als bij het paard, naar ik heb kunnen aantonen ¹⁾. Methoden, zooals die van WRIGHT, welke slechts met een paar bloeddruppels werken, waren ook voor mijn doel minder geschikt; immers het voordeel van de methode, die wij bij het paard volgden, was, dat we konden beschikken over een groot aantal witte bloedlichaampjes.

Nu is reeds geruimen tijd als methode tot het verkrijgen van leucocyten in ruime hoeveelheid bekend die, welke berust op de vorming van een z.n. steriel exsudaat, d.w.z. de opvoeding van witte bloedlichaampjes door emigratie uit de bloedbaan als gevolg van een plaatselijke inspuiting van z.n. chemotactisch werkzame stoffen. Veelvuldig in gebruik hiervoor is aleuronaat, al of niet te zamen met stijfsel, en met water gemengd toegediend. Het mengsel wordt dan veelal in een

¹⁾ J. DE HAAN: Biochem. Zeitschrift, I. c.

der lichaamsholten gespoten, de inspuiting wordt nog eens herhaald, en eenigen tijd na deze tweede inspuiting bevindt zich in de lichaamsholte een groote hoeveelheid witte bloedlichaampjes; deze worden dan meestal verkregen door het dier te dooden en met een pipet het exsudaat uit de geopende lichaamsholte op te zuigen; of wel men doodt het dier niet, en aspireert het exsudaat. De methode is zóó veelvuldig gebruikt, dat het mij onnoodig voorkomt hieromtrent nog nadere literatuuropgaven te doen. Vaak gebruikt is ook inspuiting eenvoudig van steriele bouillon.

Van het principe van deze methode maakte ik nu voor verdere onderzoekingen gebruik.

Het leek me zeer omslachtig en kostbaar, om aan elke proef een proefdier op te offeren en het bleek me ook spoedig, dat dit geheel onnoodig is.

Ik wijzigde n.l. deze methode zoodanig, dat niet het aleuro-naat-stijfsel, maar de tevens toegediende vloeistof hoofdzaak werd, zoodat het exsudaat zich kon vormen in een groote hoeveelheid vloeistof, welke, zonder dat men het dier doodt, gemakkelijk kon worden terugverkregen. Tot dit doel bracht ik onder voorzorgen van steriliteit (die trouwens, zooals mij bleek, bij het konijn nauwelijks noodig zijn) ongeveer 200 cc. uitgekookte NaCl 0.9 door middel van een troicart, gummislang en trechter in de buikholte van een konijn; eerst voegde ik aan deze vloeistof ongeveer een gram niet voorbehandeld zetmeel toe, ten einde tevens zoo mogelijk phagocytose in vivo te kunnen bestudeeren. Later verving ik dit zetmeel door ongeveer 0.5—1 gram stijfsel. Door na een zekeren tijd de troicart wederom in te brengen, gelukt het bijna zonder uitzondering, een groote hoeveelheid van een bijna zuivere leucocytensuspensie te verkrijgen.

Het konijn reageert op deze inspuiting op de volgende wijze: in betrekkelijk korten tijd wordt het grootste deel van de ingebrachte vloeistof geresorbeerd; als men $\pm$ 6 uur na de eerste inspuiting de vloeistof tracht terug te krijgen, vindt men gewoonlijk heel weinig.

Naast deze resorptie komt het evenwel tot een reactie van het lichaam in den vorm van een exsudaatvorming. Deze is in de eerste uren na de eerste inspuiting nog gering; als men dan na 2—3 uur het vocht uithevelt, verkrijgt men een cellenarme vloeistof, waarvan de cellige elementen voor verreweg het grootste deel bestaan uit grootere en kleinere mononucleaire cellen, dus van het type, dat ook normaal in het vocht der sereuze holten aanwezig is. Tracht men nu 24 uur later wederom iets uit te hevelen, dan is alle vloeistof reeds geresorbeerd; toch zijn er dan reeds veel leucocyten in de buikholte, hetgeen blijkt als men met een hoeveelheid NaCl 0.9 de buikholte uitspoelt; in de troebele vloeistof bevinden zich dan reeds een groot aantal cellen van het type der exsudaatcellen met polymorphe kern en sterke korreling van het protoplasma.

Wanneer men nu evenwel de buikholte niet uitspoelt, maar de inspuiting herhaalt, kan men 3—5 uur later gemakkelijk een dikke leucocyten suspensie aftappen. In enkele gevallen is ook dan reeds het vocht te veel geresorbeerd, zoodat er spontaan geen vloeistof afloopt. Naspoelen met NaCl 0.9 is dan voldoende, om de suspensie te verkrijgen.

Voor het afnemen van het vocht is een gewone troicartcanule niet voldoende, omdat bij het uithevelen de opening van de canule direct door darm of mesenterium zou worden afgesloten. Ik liet daarom in den wand der canule eenige zijopeningen maken; op deze wijze gaat het aftappen dan bijna steeds spontaan in zijn werk.

In den loop van het onderzoek heb ik de ingreep zeker veel meer dan 100 maal verricht.

De eenige moeilijkheden, die er zich bij kunnen voordoen, zijn de volgende: de troicart, zelfs de dunnere soorten, die ik gebruikte, laat zich vaak slechts met moeite naar binnen brengen, daar de huid van het konijn taai is en de buikwand te weinig onder spanning staat; in dit opzicht zijn wijfjes verre te verkiezen boven mannetjes, omdat de huid van de laatste veel taaier is. Door oefening wordt dit bezwaar meestal overwonnen; het is het best eerst door te steken tot de weerstand van de huid is geweken, daarna de huid in een plooi op te nemen, en in eens de spierlaag te doorboren, tot er geen weerstand meer wordt gevoeld, dan direct te stoppen en de troicart uit de canule terug te trekken. Het inbrengen van de vloeistof zou gemakkelijker gaan met gewone injectienaalden, waarmee men zonder veel moeite de huid kan doorboren, maar de puntige naalden zouden gedurende den tijd, dat ze voor het inbrengen der vloeistof in de buikholte moeten blijven, gemakkelijk laesies kunnen veroorzaken, wat voor de troicartcanule onmogelijk is.

In mijn latere proeven combineerde ik beide methoden, door als canulevoerder niet te gebruiken de solide troicartstift, maar een holle naald.

Soms, en hiertegen zijn weinig maatregelen te nemen, kan het tot een bloeding komen van uit den buikwand of de buikorganen; men krijgt dan een suspensie, vermengd met meer of minder roode bloedlichaampjes. Soms ook prikt men in den darm en uit de canule komen faecale massa's, meest uit het voorliggende coecum. Deze laatste complicatie leek me eerst zeer ernstig, maar bleek later zeer onschuldig te zijn; van de verschillende gevallen, waar het voorkwam, eindigde geen enkel doodelijk.

Hoogstens was het konijn een dag minder wel en wat suf, zonder eetlust; in één geval, waar de geheele buikholte vol faeces zat, was toch het konijn na een paar dagen weer gezond. Of bij dit gunstig verloop de voorafgaande inspuitingen ook van invloed zijn, doordat het konijn als 't ware is voorbehandeld, heb ik tot nu toe niet nader onderzocht. Op bloeding zoowel als op het aanprikken van den darm heeft men het meest kans bij een zeer taaie buikhuid, als men veel kracht moet aanwenden om den weerstand te overwinnen, en daardoor niet voelt, wat men doet; en verder veel meer, als men eenzelfde konijn reeds herhaalde malen heeft gebruikt, omdat dan de buikwand reeds hyperaemisch is, en er verder hier en daar vaak darmadhaesies zijn. Ik nam daarom steeds zooveel mogelijk de voorzorg, een versche insteekopening te kiezen. Dit had tot gevolg, dat bij mijn latere proeven bloeding zoowel als het aanprikken van een darm zeldzaam zijn geworden.

Het bleek me, dat men eenzelfde konijn een nagenoeg onbeperkt aantal malen kan gebruiken, zonder dat het dier er noemenswaard last van ondervindt. Ik gebruik een geheele serie konijnen, waarvan sommige zeker meer dan 20 maal zijn behandeld, die nog steeds geheel normaal zijn. Alleen treedt op den duur, wanneer na eenige injecties het dier niet telkens een rustpauze van ongeveer een week wordt gelaten, wel een aanmerkelijke vermagering op. Na de eerste injectie gebruiken de dieren gewoonlijk den eersten dag geen voedsel, maar bij latere inspuitingen ziet men dit verschijnsel gewoonlijk niet meer.

Ook is het bij herhaald gebruik van eenzelfde konijn niet meer noodig, telkens twee injecties te verrichten voor het verkrijgen van de suspensie. Het is dan voldoende het konijn 's morgens in te spuiten, dan kan men 4—6 uur later de

suspensie afnemen. Het konijn wordt dus door vorige injecties als het ware geprepareerd.

Ook volstond ik vaak met het inbrengen van physiologische zoutoplossing alleen, zonder stijfseel; de exsudaatvorming trad ook dan prompt op.

De hoeveelheid vloeistof, die men op deze wijze kan verkrijgen, wisselt tusschen ruime grenzen, afhankelijk van de snelheid van resorptie; gewoonlijk bedraagt zij 50—100 c.c.; het aantal leucocyten, dat zich hierin bevindt, neemt toe, naarmate de tijd na de laatste injectie langer genomen wordt, en verder met het aantal voorbereidende injecties. Wanneer men een reeds vroeger gebruikt konijn neemt, is het volume er van (door centrifugeeren bepaald) ongeveer 5 uur na de eerste injectie $\pm 0.5 - 1$ c.c.; herhaalt men evenwel de injectie, dan kan men 5 uur na de 2^e injectie wel een volume van 1—3 c.c. verkrijgen, d.w.z. meer, dan het totale aantal in het bloed.

Het bleek me, dat de methode zich met evenveel succes op andere dieren laat toepassen; ook caviae en geiten lieten zich zeer goed voor dit doel gebruiken; bij kleinere dieren, zooals de caviae, doet men evenwel beter, in plaats van de troicart een gewone dunne injectienaald te nemen, omdat ik, vooral bij de kleinere exemplaren, met een troicart een enkele maal een doodelijke inwendige bloeding kreeg door miltverwonding; de troicart is voor deze kleine dieren een te grof instrument. Geiten bleken al even goed bestand tegen darmverwonding als konijnen.

Bij grootere dieren, zooals geiten, kan men op deze wijze gemakkelijk groote hoeveelheden leucocyten krijgen.

De methode lijkt me, waar ze zoo gemakkelijk is toe te passen en te herhalen, uitermate geschikt, om het leven en de stofwisseling der polynucleaire leucocyten nader te bestudeeren,

en verder om den invloed na te gaan, welke een voortdurende onttrekking van dit soort cellen heeft op het bloedbeeld van het dier. Hierop kom ik in latere hoofdstukken nog terug.

Wat de eigenschappen van de uitgehevelde suspensie betreft, meestal is ze vrij dun, maar vaak ook, als zij veel leucocyten bevat, nadert haar karakter dat van echte pus. Zij is dan slijmerig, draden trekkend; de vloeistof reduceert meestal, nadat ze eiwitvrij is gemaakt, FEHLING's proefvocht in geringe mate, misschien voor een deel een gevolg van de omzetting van de ingebrachte stijfsel in glucose; de amyllumreactie op stijfsel is altijd negatief. Verder is het eiwitgehalte van de vloeistof vrij constant, n.l. ongeveer 1.2—1.3 $\frac{0}{10}$, zooals volgens schatting met de methode van ESBACH zonder uitzondering werd gevonden. Het eiwitgehalte komt dus ongeveer overeen met dat van lympe, niet met dat van echte exsudaten.

Aan zich zelf overgelaten stolt de massa vrij spoedig; men kan dat vertragen, door de vloeistof op te vangen in ongeveer vier deelen NaCl 0.9, of het ook geheel verhinderen door opvangen in Na-citraatoplossing evenals paardenbloed. Door de zoo verkregen vloeistof 2—3 maal uit te wasschen met NaCl 0.9, krijgt men dan de verlangde leucocytensuspensie.

Zooals reeds is opgemerkt, bevat de suspensie, wat zijn cellige elementen betreft, in hoofdzaak neutrophiele polymorphkernige leucocyten; wisselend in aantal, maar tegenover de zoeven genoemde toch altijd op den achtergrond tredend, verder kleinere en grootere eenkernige cellen, z.n. macrophagen, en ten slotte een kleiner of grooter aantal roode bloedlichaampjes, meestal zeer weinig.

De polynucleaire leucocyten zijn bij het konijn duidelijk grof gekorrelt; nu is het bekend, dat deze korreling bij het konijn

grover is dan bij andere dieren; bij de cavia en vooral bij de geit was de korreling fijner. De granulatie, en vaak eveneens het protoplasma dezer cellen had een sterke affiniteit tot Jodium; dat bleek me, toen ik voor het bepalen van de amylumphagocytose op de gewone wijze J. J. K opl. toevoegde op het objectglas. De leucocyten van het paard werden dan hoogstens geel; hier werden van de meeste leucocyten de granulaties bruinzwart, vaak zelfs het geheele protoplasma met uitzondering van de kern. De z. n. macrophagen waren dan als veel bleekere, nagenoeg ongekorrelde cellen gemakkelijk te onderscheiden. Op deze *jodophilie* kom ik in een volgend hoofdstuk terug.

b) Phagocytose door exsudaatleucocyten in verschillend milieu; vergelijking met de leucocyten van andere dieren.

Voor de onderzoeken over de phagocytose bij deze exsudaatleucocyten maakte ik bijna uitsluitend gebruik van amylum oryzae.

In den beginne bleken deze leucocyten zich in vele opzichten overeenkomstig te gedragen als de leucocyten van het paard, en ik was daardoor geneigd te denken, dat door het verschillend milieu, waaruit in beide gevallen de leucocyten werden verkregen, toch het wezen dezer cellen niet beïnvloed werd. Latere proeven zouden me evenwel doen zien, dat wel een essentieel verschil hiermee gepaard gaat; m. a. w. dat men de eigenschappen, welke ik constateerde bij de exsudaatcellen van het konijn, niet zomaar kon aannemen als te zijn eigen aan alle leucocyten van het konijn, ook die uit het bloed; en dat verder de leucocyten van het paard, zooals ze uit het bloed worden verkregen, zich waarschijnlijk anders zullen gedragen, dan wanneer ik ze eveneens uit exsudaten had onderzocht.

Voorloopig viel er evenwel, zooals gezegd, een groote overeenkomst te constateeren¹⁾; de exsudaatleucocyten phagocyteerden amyllum in NaCl 0.9 slechts in onbeteekenende mate, sterk daarentegen in verschillende verdunningen van konijnenserum. Ik vond, dat toevoeging van CaCl_2 aan een Ca-vrij of Ca-arm milieu ook hier de phagocytose sterk doet toenemen, dat dus de aanwezigheid van Ca-ionen van fundamenteele beteekenis schijnt voor het tot stand komen der phagocytose. Deze werking van het Ca-ion zal overigens bij de vermelding van de nu volgende proeven nog wel ten overvloede blijken.

Bij vroegere proeven bleek een bevorderende werking op de phagocytose door het Ca nog te blijven bestaan bij een gehalte aan Ca-ionen, waarbij zeer veel andere levensprocessen reeds tot stilstand komen of gewijzigd worden, b.v. darmbewegingen en volgens HAMBURGER en BRINKMAN²⁾ ook de impermeabiliteit der nieren voor glucose.

Toch was ook bij aanwezigheid van Ca-ionen de phagocytose bij gebruik van NaCl 0.9 als grondvloeistof nog betrekkelijk heel laag, als men ze vergeleek met de phagocytose van amyllum in serum bevattende oplossingen. De vraag rijst nu: wordt dit groote verschil alleen veroorzaakt door de werking van bepaalde (colloïde) serumstoffen in den zin van complement, zooals men geneigd is te denken, of is het veroorzaakt door de aanwezigheid of afwezigheid van bepaalde ionen in het serum-NaCl mengsel? Dit laatste was niet bij voorbaat onmogelijk. Immers het had reeds lang mijn aandacht getrokken, dat het gedestilleerde water, gebruikt voor het bereiden van de verschillende oplossingen, tamelijk zuur reageerde. Nu was

¹⁾ Zie hierover J. DE HAAN: Arch. Neerland. de Physiol. II 4 p. 674.

²⁾ Zie o.a. Biochemische Zeitschrift 88, Hft. 1—3, p. 97.

dit in zooverre voor de vroegere proeven van weinig beteekenis geweest, dat bij de vergelijking in de werking van verschillende vloeistoffen steeds van hetzelfde gedestilleerd water werd uitgegaan. Maar toch moet met dit hooge aantal H-ionen worden rekening gehouden, waar wel bekend is, dat een geringe wijziging in het aantal H-ionen van zeer grooten invloed kan zijn op verschillende levensprocessen; verder zal het aantal H-ionen de concentratie van andere werkzame ionen beïnvloeden.

Zoo vonden HAMBURGER en BRINKMAN ¹⁾ den grooten invloed die een nauwkeurige balanceering van verschillende ionen heeft op de permeabiliteit van kikkernieren voor glucose; het glomerulusepitheel is dan alleen impermeabel voor glucose, als het in aanraking is met een vloeistof, die een nauwkeurig afgemast aantal Ca-ionen bevat. Nu wordt in de lichaamsvloeistoffen deze afpassing van het aantal Ca-ionen mede bewerkt door het koolzuurgehalte, in dien zin dat het zich instelt volgens een evenwichtsreactie, waarin behalve Ca ook H- en HCO_3 -ionen factoren zijn. Hieruit volgt dan, dat het aantal H-ionen van zeer groot gewicht is, en het was dus zeer zeker van belang na te gaan, in hoeverre de phagocytose er door wordt beïnvloed, ook in vergelijking met het aantal Ca-ionen.

Nu is boven reeds opgemerkt, dat nog bij zeer groote Ca-hoeveelheden phagocytose mogelijk is, ja dat deze hoeveelheden zelfs nog phagocytosebevorderend werken, wanneer ze aan physiologische keukenzoutoplossing worden toegevoegd. Zelfs bij een CaCl_2 -gehalte van 0.15 "‰ was deze bevordering nog onverminderd. Als we dus uitgaan van de onderstelling, dat

¹⁾ l. c.

de feiten, door HAMBURGER en BRINKMAN gevonden, voor de levensverschijnselen van alle lichaamscellen gelden, dat deze dus alle alleen bij een nauwkeurige ionenbalanceering goed kunnen functioneeren, zou door het bovenstaande weder de stelling, dat de phagocytose niet per se een levensuiting is, nog eens duidelijker belicht worden.

Zooals reeds werd opgemerkt, bleef evenwel in zuivere NaCl 0.9 oplossing, ook na toevoeging van Ca, de phagocytose nog onbeduidend in vergelijking met die in serumverduunningen. De mogelijkheid bestond, dat dit een gevolg was van het te hooge gehalte aan H-ionen van de vloeistof; immers door toevoeging van serum wordt dit aantal H-ionen gereduceerd, zooals blijkt uit de kleursverandering van neutraalrood, als men een weinig serum toevoegt aan NaCl 0.9. Ik moest dus rekening houden met de mogelijkheid, dat ik een veel betere phagocytose van amyllum zou krijgen door het aantal H-ionen in de NaCl 0.9 te reduceeren tot de neutrale reactie, en verder, dat dan mogelijkerwijze ook een optimum aan Ca-ionen gehalte zou gevonden worden; m.a.w. dat ook een *spontane phagocytose van amyllum* zonder behulp van specifieke serumstoffen mogelijk zou zijn, als de hoeveelheid der samenstellende ionen zooveel mogelijk in overeenstemming was met die der lichaamsvochten.

Ik heb mij er daarbij eerst toe bepaald, eenvoudige mengsels van CaCl_2 en NaCl te onderzoeken bij verschillend H-ionen gehalte, en vervolgens vloeistoffen, welke ook andere ionen bevatten, o.a. RINGER'S oplossing en ultrafiltraat.

Een voorproef leerde me reeds direct, dat een geringe milieuwijziging in dit opzicht groot effect kan hebben. Ik vergeleek n.l. de phagocytose van exsudaatleucocyten van het konijn in de volgende vloeistoffen: 1) NaCl 0.9, 2) NaCl 0.9 en CaCl_2

0.025, 3) RINGER'S vloeistof volgens de door BRINKMAN gewijzigde samenstelling ¹⁾, 4) ultrafiltraat versch bereid uit konijneserum. De reactie dezer vloeistoffen, bepaald met neutraalrood, was: 1) en 2) zuur, 3) neutraal, 4) alkalisch (zooals bekend slaat de kleur van neutraalrood om ongeveer juist bij neutrale reactie).

TABEL XIV.

Gebruikt werd een konijn, dat reeds vaker was ingespoten, en bij hetwelk voor een ander doel reeds denzelfden dag leucocyten waren afgenomen; direct hierna was opnieuw vloeistof ingebracht, en bijna 3 uur later werd opnieuw een leucocyten suspensie verkregen; na 3 × uitwasschen met NaCl 0.9 wordt een kleine hoeveelheid leucocyten met amylum toegevoegd aan de bovengenoemde vloeistoffen; verblijf op 37° C. 45 min.; sublimatefixatie.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt :	Procentgetal der leucocyten, die amylum hebben opgenomen :
NaCl 0.9	$\frac{21}{338} = 6.2\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.025	$\frac{48}{324} = 14.8\%$
Gewijzigde Ringeroplossing	$\frac{77}{233} = 33\%$
Ultrafiltraat uit konijnenserum	$\frac{12}{326} = 3.6\%$

Opvallend was de sterke agglutinatie van de leucocyten met amylum in de gewijzigde RINGER-oplossing, waardoor

¹⁾ Deze samenstelling is: NaCl 7, KCl 0.2, NaHCO₃ 1.8, CaCl₂ 6 aq 0.2 op 1 L. uitgekookt gedestilleerd water; daarna zooveel koolzuur doorleiden, tot de reactie nauwkeurig neutraal is (oranjerood met neutraalrood).

de telling bemoeilijkt werd. De andere drie vloeistoffen weken, ter eener of ter anderer zijde, wat hun H-ionen gehalte betreft, af van het physiologische, en in alle drie vindt men ook een veel geringere phagocytose, hoewel de bevorderende werking van het Ca nog wel zichtbaar is. Merkwaardig is vooral de lage phagocytose in ultrafiltraat. Op de verklaring van dit verschijnsel kom ik straks terug.

Toen ik nu verder den invloed van verschillende Ca-hoeveelheden bij verschillend aantal H-ionen nader onderzocht, wezen de eerste proeven weer sterk er op, dat het mogelijk is, om ook in serumvrij of liever colloïdvrij medium een sterke phagocytose van amyllum te verkrijgen, wanneer we slechts rekening houden met de noodzakelijkheid, dat een juiste H-ionen concentratie bewaard blijft. Daarentegen bleek ook nu de hoef. Ca-ionen, noodig voor de optimumphagocytose, niet binnen enge grenzen beperkt te zijn: vergelijk de tabellen XV en XVI.

De reductie van het aantal H-ionen tot neutrale reactie doet reeds zonder aanwezigheid van CaCl_2 de phagocytose sterk stijgen; verdere toevoeging van CaCl_2 veroorzaakt dan nagenoeg maximale phagocytose; bij aanwezigheid van CaCl_2 wordt de phagocytose weer geringer (zie 2^e helft tabel XV), als de reactie te zuur of te alkalisch wordt.

Dit wordt nog duidelijker, als we de cijfers in tabel XVI nagaan; de proef is hier op geheel dezelfde wijze ingericht; alleen is naast wisselend Ca-ionen gehalte bij constant aantal H-ionen ook zuivere NaCl 0.9 opl. onderzocht bij wisselend aantal H-ionen. Wederom doet vermindering van het aantal H-ionen tot neutrale reactie de phagocytose stijgen, verdere vermindering daarentegen deze tot nul dalen; wederom komt bij vermindering van het aantal H-ionen ook de bevorderende invloed van Ca-toevoeging duidelijker uit; CaCl_2 concentraties

TABEL XV.

Leucocyten suspensie konijn, verkregen 3 uur na eerste inspuiting, wordt op de gewone wijze uitgewasschen. en daarna met amyllum toegevoegd aan de oplossingen, in de tabel genoemd; de eerste serie dezer oplossingen bevat constant H-ionen gehalte bij wisselend Ca-gehalte; dit is verkregen door bij elke vloeistof zoolang n 10 NaOH te voegen, dat de kleur met neutraalrood overal gelijkelijk oranje-rood is; de tweede serie omvat vloeistoffen met een constant CaCl_2 gehalte en wisselend aantal H-ionen. Inwerkingstijd op 37°C . bedraagt 40 min.; daarna sublimaatfixatie.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:	Procentgehalte der leucocyten, welke amyllum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{41}{236} = 17.3\%$
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{236}{530} = 44.5\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0015 (neutraal)	$\frac{255}{365} = 69.8\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.003 (neutraal)	$\frac{272}{364} = 74.7\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.006 (neutraal)	$\frac{213}{283} = 75.2\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.012 (neutraal)	$\frac{372}{480} = 77.5\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.025 (neutraal)	$\frac{317}{418} = 75.8\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0125 (zuur)	$\frac{182}{315} = 57.7\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0125 + $\text{NaOH} \frac{n}{15000}$ (zuur)	$\frac{212}{274} = 77.3\%$
" + " + $\text{NaOH} \frac{n}{7500}$ (iets te zuur)	$\frac{194}{244} = 79.5\%$
" + " + $\text{NaOH} \frac{n}{6000}$ (iets te zuur)	$\frac{159}{204} = 77.9\%$
" + " + $\text{NaOH} \frac{n}{3000}$ (neutraal)	$\frac{210}{277} = 75.8\%$
" + " + $\text{NaOH} \frac{n}{2000}$ (alkalisch)	$\frac{182}{307} = 59.2\%$

TABEL XVI.

Inwerking 30 min. op 37° C.; sublimatefixatie.

Oplossingen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:	Procentgehalte der leucocyten, welke amyllum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{40}{368} = 10.8\%$
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{79}{251} = 31.4\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125	$\frac{136}{331} = 41\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.1 (neutraal)	$\frac{294}{416} = 70.6\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.04 (neutraal)	$\frac{178}{265} = 67.1\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.02 (neutraal)	$\frac{250}{340} = 73.5\%$
NaCl 0.9 (zuur)	$\frac{44}{241} = 18.2\%$
NaCl 0.9 + NaOH $\frac{n}{1000}$ (alkalisch)	$\frac{0}{147} = 0\%$
NaCl 0.9 + NaOH $\frac{n}{2000}$ (alkalisch)	$\frac{0}{92} = 0\%$
NaCl 0.9 + NaOH $\frac{n}{4000}$ (iets te alkalisch)	$\frac{81}{265} = 30.5\%$
NaCl 0.9 + NaOH $\frac{n}{5000}$ (neutraal)	$\frac{57}{155} = 36.7\%$
NaCl 0.9 + NaOH $\frac{n}{10000}$ (iets te zuur)	$\frac{61}{197} = 30.9\%$
NaCl 0.9 + NaOH $\frac{n}{20000}$ (zuur)	$\frac{33}{178} = 18.5\%$

van 0.1% werken niet anders dan zwakkere. De phagocytose blijkt mogelijk binnen betrekkelijk ruime grenzen van H-ionen-concentratie.

Afgaande op deze beide proeven zou men dus kunnen concludeeren, dat het werkelijk mogelijk is, in eiwitvrij milieu

bij juiste doseering van ionen een maximale phagocytose te verkrijgen, even groot als in serum bevattende oplossingen.

Invloed van den tijd, gedurende welken de leucocyten in de buikholte verbleven, op hun phagocytosevermogen.

Vergelijking tusschen Ca-houdend eiwitvrij milieu en serumverduningen.

In een reeks volgende proeven, welke ik instelde om deze onderstelling te toetsen, en dus de werking van $\text{NaCl}-\text{CaCl}_2$ mengsels ter vergelijking met serumhoudend NaCl 0.9 onderzocht, bleek me evenwel, dat een vaste lijn hierbij niet bestaat: in de eerste plaats kreeg ik nagenoeg nooit weer een zoo hooge phagocytose in neutrale $\text{NaCl}-\text{CaCl}_2$ oplossingen, als bij de zooeven genoemde proeven; steeds bleef ze veel lager dan de phagocytose, welke aanwezig is in een eenigszins geconcentreerde serumverduunning, b.v. 1 serum op 5 NaCl 0.9. Dit verschil met de reeds genoemde proeven heeft waarschijnlijk een zeer natuurlijke verklaring: de eerste proeven werden verricht met leucocyten, welke slechts zeer kort geleden in de buikholte waren getreden; immers de vloeistoffen werden hoogstens 3 uur na de 1e injectie wederom afgetapt. De verdere, nu volgende proeven betroffen daarentegen witte bloedlichaampjes, waarbij de 1e injectie reeds veel langer geleden was (minstens 5 uur, soms meer dan een dag), en waar de exsudaatcellen dus reeds veel langer in de buikholte verbleven. Wanneer ik nu het resultaat van al mijne proeven naga, dan *blijkt de phagocytose in eiwitvrije oplossingen steeds hooger, naarmate verwacht kan worden, dat de witte bloedlichaampjes korter in de buikholte hebben vertoefd*. Is dat verblijf kort (tabel XV en XVI en in mindere mate ook tabel XIV), dan vindt men zelfs een aanmerkelijke phagocytose in zuivere NaCl 0.9, welke door toevoeging van CaCl_2 maximaal kan worden bij neutrale reactie. Na een langer verblijf in de buikholte daalt evenwel de phagocytose in NaCl 0.9 meer en meer tot nul, na toevoeging van CaCl_2 en reductie van het aantal H-ionen is zij nog

in verschillende mate te versterken, maar blijft steeds veel lager dan in serumverduunningen.

De tabellen XVII tot XXI leveren hiervan een duidelijke illustratie.

TABEL XVII.

Konijn is op 3 achtereenvolgende dagen ingespoten. Op den derden dag wordt, na een herhaalde inspuiting 's morgens, eenige uren later een zeer dikke suspensie afgenomen. De witte bloedlichaampjes moeten dus grootendeels reeds 1—2 dagen in de buikholte hebben vertoefd. Deze worden onderzocht in een groot aantal vloeistoffen, waarvan ik voor deze tabel alleen die kies, welke op het boven besprokene betrekking hebben. Inwerking der media bij 30° C. 40 min.¹⁾; 10 min. afkoeling; daarna formol- en sublimaatfixatie.

Vloeistoffen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:	Procentgehalte der leucocyten, welke amyllum hebben opgenomen:
Serum	$\frac{217}{301} = 72 \text{ } \%$
Serum $\frac{1}{2}$	$\frac{172}{321} = 53.5 \text{ } \%$
Serum $\frac{1}{4}$	$\frac{159}{276} = 57.6 \text{ } \%$
Serum $\frac{1}{8}$	$\frac{97}{227} = 42.7 \text{ } \%$
Serum $\frac{1}{20}$	$\frac{52}{243} = 21.4 \text{ } \%$
NaCl 0.9	$\frac{2}{242} = 0.8 \text{ } \%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.001 (neutraal)	$\frac{21}{347} = 6.6 \text{ } \%$

¹⁾ Waar bij verschillende proeven een temperatuur van inwerking lager dan 37° C. is opgegeven, is dit een gevolg daarvan, dat door onvoldoende gastoevoer in de broedstoof geen voldoende hooge temperatuur kon worden bereikt.

TABEL XVIII.

Leucocyten eveneens afkomstig van een konijn, dat reeds 2 dagen was voorbehandeld. Expositietijd op 37° C. 45 min. Sublimaafixatie na afkoeling.

Vloeistoffen, welke hebben ingewerkt:	Procentgehalte der leucocyten, welke amylum hebben opgenomen :
NaCl 0.9	$\frac{0}{320} = 0\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.015 (neutraal)	$\frac{24}{186} = 12.9\%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{108}{161} = 61.9\%$

In tabel N^o. XIX was de duur van het verblijf in de buikholte der leucocyten ongeveer 6 uur; de phagocytose is hier èn in NaCl 0.9 èn in CaCl₂ houdende oplossing dan ook sterker; ook deze tabel is gelicht uit een meer uitgebreide proef.

TABEL XIX.

Expositietijd op 37° C. 35 min.; afkoeling; sublimaafixatie.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgehalte der leucocyten, welke amylum hebben opgenomen :
NaCl 0.9	$\frac{21}{257} = 8.1\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125 (neutraal)	$\frac{113}{308} = 36.6\%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{196}{252} = 77.7\%$

In tabel XX en XXI hebben we te doen met leucocyten van een en hetzelfde konijn, afgenomen op twee achtereenvolgende dagen, de eerste 3 uur na de injectie, de laatste ongeveer 18 uur. Dit verschil komt in de phagocytose weer sterk tot uiting.

Op de meeste dezer tabellen zal ik in ander verband nog gelegenheid hebben terug te komen.

TABEL XX.

Expositietijd op 37° C. een half uur; na afkoeling sublimaafixatie.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgehalte der leucocyten, welke amyllum hebben opgenomen:
NaCl 0.9 ‰	$\frac{32}{204} = 15.6 \%$
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{45}{190} = 23.6 \%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125 (neutraal)	$\frac{117}{211} = 55.4 \%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{217}{237} = 91.5 \%$

TABEL XXI.

Verblijf op 37° C. $\frac{1}{2}$ uur; na afkoeling sublimaafixatie.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal der leucocyten, die amyllum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{2}{230} = 0.9 \%$
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{6}{208} = 2.8 \%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125 (neutraal)	$\frac{43}{364} = 11.8 \%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{132}{250} = 52.8 \%$

Summa summarum blijkt dus wel, dat een zeker aantal Ca-ionen bij afgepast aantal H-ionen in physiologische zout-solutie niet voldoende is, om een optimum phagocytose van amyllum te bewerkstelligen. Een serumverdunding doet dit veel beter.

Omtrent het verband tusschen de mate van phagocytose en de levensverhoudingen van het witte bloedlichaampje kunnen deze proeven nog geen inzicht verschaffen; wel zien we in 't algemeen de phagocytose toenemen, naarmate het milieu meer physiologisch is (werking van Ca en neutrale reactie), maar aan den anderen kant zien we geen afname der phagocytose bij een te groote hoeveelheid Ca; terwijl verder in NaCl 0.9, dat een weinig serum bevat, en wat zijn ionen aangaat, zeker ook niet physiologisch kan worden genoemd, vrijwel maximale phagocytose wordt aangetroffen.

Werking van
ultrafiltraat en
van gewijzigde
Ringer-oplos-
sing.

Hoe verhoudt zich nu de phagocytose, wanneer we het eiwitvrije milieu nog meer physiologisch maken door toevoeging van andere ionen van het bloedserum? De normale toestand het meest nabij komt in dit opzicht zeer zeker het *ultrafiltraat* van serum, dat alle kristalloïden en ionen ongeveer in de verhouding van het serum zal bevatten. Evenals serum is het evenwel (door koolzuurverlies) te alkalisch geworden: met neutraalrood krijgt het regelmatig een gele tint. Nu kan de normale neutraliteit er evenwel aan worden teruggegeven, wanneer men korten tijd koolzuur doorleidt, totdat neutraalrood weer de oranjeroode tint geeft. Ter verkrijging van ultrafiltraat maakte ik gebruik van serum van verschillende dieren (konijn, rund, paard, varken); dit werd zoo snel mogelijk in ultrafilters van zoo groot mogelijke capaciteit onder ± 5 atmosferen druk gefiltreerd; de ultrafilters werden in al hun onderdeelen vooraf zorgvuldig gereinigd, en steeds het eerste gedeelte van het filtraat, dat nog iets water van het celloidine-filtreerpapier zal bevatten, weggeworpen. De metalen onderlaag van het filter bestond uit zwaar vergulde platen, omdat gebleken was, dat gewoon vernikkelde platen een aanmerkelijke hoeveelheid nikkel afstonden aan het filtraat.

In de volgende tabellen XXII tot XXVII geef ik de phagocytose, zooals ze gevonden werd in ultrafiltraat, meestal vergeleken met die in NaCl 0.9, waaraan al of niet CaCl_2 was

TABEL XXII.

(Heeft betrekking op dezelfde proef als tabel XXI).

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, welke amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{2}{230} = 0.9\%$
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{6}{208} = 2.8\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0125 (neutraal)	$\frac{43}{364} = 11.8\%$
Gewijzigde Ringer opl.	$\frac{31}{283} = 10.9\%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{132}{250} = 52.8\%$

TABEL XXIII.

Leucocyten na verblijf van ongeveer 1 dag in de buikholte. Expositietijd op 37°C . $\frac{1}{2}$ uur. Afkoeling; sublimatefixatie.

Vloeistoffen, welke hebben ingewerkt:	Procentgetal der leucocyten, welke amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{0}{310} = 0\%$
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0125 (neutraal)	$\frac{0}{231} = 0\%$
Ultrafiltraat konijn	$\frac{3}{211} = 1.4\%$
Ultrafiltraat konijn, neutraal gemaakt door CO_2 -doorleiden	$\frac{13}{256} = 5\%$
Ultrafiltraat rund, neutraal met CO_2	$\frac{77}{411} = 18.7\%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{124}{299} = 41.4\%$

toegevoegd; in tabel XXII is de gewijzigde RINGER-oplossing (samenstelling zie pag. 52) in het onderzoek betrokken.

We zien, dat de gewijzigde RINGER-oplossing, wat de phagocytose aangaat, geen betere resultaten geeft dan een goed

TABEL XXIV.

(behoorende bij dezelfde proef als tabel XIX).

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal der leucocyten, die amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{21}{257} = 8.1\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125 (neutraal)	$\frac{113}{308} = 36.6\%$
Ultrafiltraat rund (neutraal)	$\frac{140}{359} = 39\%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{196}{256} = 77.7\%$

TABEL XXV.

Leucocyten 6 uur in de buikholte; expositietijd op 33° C. $\frac{1}{2}$ uur; afkoeling; sublimatefixatie.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, die amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{0}{351} = 0\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125 (neutraal)	$\frac{72}{334} = 21.7\%$
Ultrafiltraat rund	$\frac{31}{177} = 17.5\%$
Ultrafiltraat rund (neutraal)	$\frac{114}{335} = 34\%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{164}{249} = 65.8\%$

TABEL XXVI.

Leucocyten 6 uur in de buikholte. Expositietijd op 37° C. 1/2 uur. Sublimaatfixatie.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt :	Procentgetal leucocyten, die amylum hebben opgenomen :
NaCl 0.9	$\frac{0}{170} = 0 \text{ ‰}$
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{0}{191} = 0 \text{ ‰}$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125 (neutraal)	$\frac{20}{131} = 15.2 \text{ ‰}$
Ultrafiltraat rund	$\frac{3}{213} = 1.4 \text{ ‰}$
Ultrafiltraat rund (neutraal)	$\frac{33}{198} = 16.6 \text{ ‰}$

TABEL XXVII.

Verblijf in de buikholte 1 dag.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt :	Procentgetal leucocyten, welke amylum hebben opgenomen :
NaCl 0.9	$\frac{3}{250} = 1.2 \text{ ‰}$
NaCl 0.9 + CaCl 0.015 (neutraal)	$\frac{16}{185} = 8.5 \text{ ‰}$
Ultrafiltraat rund	$\frac{6}{176} = 3.4 \text{ ‰}$
Ultrafiltraat rund (neutraal)	$\frac{42}{140} = 30 \text{ ‰}$

geneutraliseerd NaCl-CaCl₂-mengsel; we kunnen dus gerust aannemen, dat de zeer sterke bevordering, die deze gewijzigde RINGER-oplossing in tabel XIV deed zien, slechts schijnbaar was, en een gevolg daarvan, dat het CaCl₂-NaCl-mengsel, waarmee werd vergeleken, niet was geneutraliseerd.

De phagocytose in ultrafiltraat wordt, dit blijkt uit al de bovenstaande tabellen, sterk beïnvloed door het aantal H-ionen van de vloeistof. Dientengevolge is zij in het gewone (alkalische) ultrafiltraat meestal zeer laag; wanneer evenwel door CO₂-doorleiding ongeveer neutrale reactie is verkregen, stijgt de phagocytose aanmerkelijk, vaak aanzienlijk hooger, dan ze gelijktijdig in het zuivere NaCl—CaCl₂ mengsel wordt gevonden, maar ook dan nog lager dan in een serumverduunning (tabel XXV). Ze is dan echter in elk geval, ook als we te doen hebben met leucocyten, die een langdurig verblijf in de buikholte achter den rug hebben, zóó hoog geworden, dat we kunnen spreken van een tamelijk sterke *spontaanphagocytose* in eiwitvrij milieu; en, afgezien van de sterke phagocytose in serum-NaCl-oplossingen, lijkt het er naar, alsof de phagocytose toeneemt, naarmate het omgevende milieu meer physiologisch wordt.

Werking van
ultrafiltraat en
andere eiwit-
vrije zoutoplos-
singen op de
phagocytose
van paarden-
leucocyten.

Toen ik echter de werking van het ultrafiltraat tegelijk ook op de leucocyten van andere dieren onderzocht, bleek me, dat we dan weer vaak een geheel ander beeld krijgen. Als voorbeeld moge dienen tabel XXVIII, waar ter vergelijking werden onderzocht versche leucocyten van het paard naast exsudaat-leucocyten van het konijn, de laatste na een verblijf van 6 uur in de buikholte, beide in dezelfde oplossingen; behalve ultrafiltraat werden tevens in het onderzoek betrokken een gewijzigde RINGER-oplossing, en tevens laatstgenoemde oplossing, waarin evenwel de K-ionen waren weggelaten, om te zien, of hierdoor de phagocytose ook wordt beïnvloed.

Uit deze proef krijgt men den indruk, dat de gewijzigde oplossing van RINGER de phagocytose zeker niet meer bevordert dan een eenvoudig CaCl₂—NaCl mengsel, eerder het tegendeel; en dat verder het ultrafiltraat bij het *paard*, in tegenstelling

TABEL XXVIII.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	PAARD Procentgetal leucocyten, die amylum hebben opgenomen :	KONIJN Procentgetal leucocyten, die amylum hebben opgenomen :
NaCl 0.9	$\frac{13}{385} = 3.3\%$	$\frac{7}{257} = 2.7\%$
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{16}{235} = 6.8\%$	$\frac{3}{209} = 1.4\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.025 (neutraal)	$\frac{92}{382} = 24\%$	$\frac{39}{250} = 15.6\%$
Gewijzigde Ringer	$\frac{9}{288} = 3.1\%$	$\frac{11}{169} = 6.4\%$
Gewijzigde Ringer zonder KCl	$\frac{12}{247} = 4.8\%$	$\frac{9}{169} = 5.2\%$
Gewijzigde Ringer met CaCl ₂ 6aq. 0.06 ¹⁾	$\frac{36}{269} = 13.3\%$	$\frac{19}{217} = 8.7\%$
Ultrafiltraat Paard (neutraal)	$\frac{33}{379} = 8.7\%$	$\frac{101}{210} = 48\%$

TABEL XXIX.

Paardenleucocyten 1 dag oud; $\frac{1}{2}$ uur op 37° C. Osmiumzuurfixatie.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, die amyllum hebben opgenomen :
NaCl 0.9	$\frac{3}{215} = 1.4\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.015 (neutraal)	$\frac{35}{352} = 10\%$
Ultrafiltraat paard	$\frac{0}{118} = 0\%$
Ultrafiltraat paard (neutraal)	$\frac{19}{210} = 9\%$
Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{84}{159} = 53.4\%$

1) In alle proeven, waar CaCl₂ met kristalwater gebruikt werd, is dit steeds aangegeven; met CaCl₂ zonder meer is dus steeds bedoeld het zout zonder aq.

met hetgeen we meestal bij het *konijn* zien, ook niet speciaal phagocytosebevorderend werkt. Dit vond ik bij mijn proeven met paardenleucocyten bijna steeds; ook tabel XXIX wijst in dezelfde richting; tevens blijkt hier wederom de veel sterkere phagocytose in serumverduunningen.

Ik kan wel zeggen dat verse paardenleucocyten constant dit resultaat gaven; een enkele maal was de uitkomst eenigszins anders, toen ik gebruik maakte van leucocyten, welke enkele dagen in serum op ijs hadden gestaan. In die enkele gevallen kreeg ik in ultrafiltraat tegenover de oplossing van RINGER en zuivere NaCl-CaCl₂-oplossingen wel een zeer sterke phagocytoseversterking, zooals tabel XXX doet zien.

TABEL XXX.

Paardeleucocyten, 4 dagen in serum bewaard; 40 min. op 37° C.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, die amyllum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{7}{226} = 3 \text{ } ^0\text{/}_0$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.05 (iets te alcalisch)	$\frac{13}{187} = 6.8 \text{ } ^0\text{/}_0$
Gewijzigde Ringer	$\frac{17}{154} = 11 \text{ } ^0\text{/}_0$
Ultrafiltraat	$\frac{9}{184} = 4.8 \text{ } ^0\text{/}_0$
Ultrafiltraat (neutraal)	$\frac{72}{174} = 41.3 \text{ } ^0\text{/}_0$

In deze proeven met oudere leucocyten was trouwens bijna steeds ook de phagocytose in NaCl 0.9 verhoogd.

Tot slot wil ik hier in tabel XXXI nog een proef vermelden met *leucocyten uit varkensbloed*, waaruit blijkt, dat deze leucocyten, wat de werking van ultrafiltraat betreft, althans in deze proef, zich gedragen als exsudaatleucocyten van het konijn.

TABEL XXXI.

Varkensbloed, opgevangen in $\frac{1}{2}$ van zijn volume citraat—NaCl. Op 37° C. geplaatst; zeer snelle bezinking der roode bloedlichaampjes. De afgehevelde suspensie wordt 18 uur later onderzocht na uitwasschen. 40 min. op 37° C.; osmiumzuurfixatie.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, die amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{1}{155} = 0.6\%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.01 (neutraal)	$\frac{26}{144} = 18\%$
Gewijzigde Ringer	$\frac{14}{181} = 7.9\%$
Ultrafiltraat rund (neutraal)	$\frac{80}{173} = 46.2\%$

Wanneer ik de resultaten van het onderzoek over de phagocytose in verschillende eiwitvrije milieu's samenvat, blijkt dus, dat:

1) *Reductie van het aantal H-ionen de phagocytose in zuivere physiologische NaCl-oplossing min of meer bevordert bij de exsudaatleucocyten van het konijn, niet noemenswaard bij paardeleucocyten.*

2) *Toevoeging van Ca-ionen de phagocytose in bovengenoemde NaCl 0.9 zoowel bij paard als konijn steeds duidelijk bevordert; deze bevordering is bij paardeleucocyten echter steeds begrensd;*

bij de exsudaatleucocyten van het konijn is zij wisselend, afhankelijk van den toestand, waarin de leucocyten verkeerden.

3) Dat andere zouten en invloeden, zooals die b.v. in de gewijzigde RINGER-oplossing gegeven zijn, de phagocytose niet merkbaar gunstig beïnvloeden tegenover zuivere NaCl - CaCl_2 -oplossingen.

4) Dat, wat het ultrafiltraat betreft, de daarin aanwezige te alkalische reactie de phagocytose zeer sterk remt; wordt evenwel door CO_2 doorvoering de neutrale reactie terug gegeven, dan is in vele gevallen de phagocytose tegenover zuivere CaCl_2 — NaCl -mengsels zeer duidelijk versterkt (bloedleucocyten varken, exsudaatleucocyten konijn, soms oudere bloedleucocyten van het paard), in vele andere gevallen echter niet noemenswaard (versche bloedleucocyten van het paard). Van een eventuele specifieke werking van ultrafiltraat van dezelfde diersoort blijkt niets.

5) Dat in al deze vloeistoffen de phagocytose nagenoeg altijd zeer veel achterstaat bij die in NaCl 0.9, waaraan een niet te kleine hoeveelheid serum is toegevoegd.

Aannemende, dat een gunstige natuurlijke zoutcombinatie, zooals die aanwezig is in ultrafiltraat en, wel is waar in mindere mate, ook in RINGER's oplossing, het leven der leucocyten gunstig moet beïnvloeden, blijkt dus uit deze proeven nog geen duidelijk verband tusschen de phagocytose en de levenseigenschappen der cel. Voor mijn conclusie in dit opzicht verwijs ik naar hoofdstuk V, waar ik op deze zaak terug kom, als in verband met andere waargenomen feiten, het geheel beter kan worden overzien.

Invloed van
serumcolloïden
op de
phagocytose.

Ik kom nu tot de groote wijziging, welke de phagocytose onder den invloed van serumtoevoeging ondergaat. De maximale

phagocytose, die hiervan het gevolg is, berust klaarblijkelijk op de aanwezigheid van colloïden in het serum; dit blijkt duidelijk, als uit het serum de colloïden worden weg gelaten: in dit ultrafiltraat is de phagocytose steeds veel zwakker, al is zij vaak nog wel zoo sterk, dat hier van een spontaan-phagocytose van amyllum kan worden gesproken.

OUWELEEN¹⁾ toonde aan, dat deze serumwerking op de amyllumphagocytose een groote overeenkomst toont met de opsoninewerking, zooals die voor bepaalde bacterien door immuunserum tot stand komt. Hij vond verder, dat de hoeveelheid serum, noodig om nog eenigszins merkbaar de phagocytose te beïnvloeden, grooter moet zijn dan 1—2 %, wanneer we als verdunningsvloeistof NaCl 0.9 gebruiken.

Nu is het evenwel de vraag, in hoeverre hier de te hooge aciditeit van NaCl 0.9 een rol kan spelen; deze zuurgraad wordt door stijgende hoeveelheden serum steeds sterker geneutraliseerd, en in die mate stijgt ook de phagocytose. Het is dus zeer goed mogelijk, dat deze zuurgraad de werking der serumstoffen op een of andere wijze wijzigt, of zelfs, dat een groot gedeelte dezer werking op binding van het te hooge aantal H-ionen berust; dat de serumwerking niet verder gaat dan 1—2 % zou misschien kunnen liggen in het feit, dat hier, zooals werkelijk het geval is, de blokwerking, door serum op den zuurgraad uitgeoefend, onvoldoende is.

Ik heb, om dit te onderzoeken, de werkzame serumconcentraties nog eens bepaald, en nu als verdunningsvloeistoffen ook genomen geneutraliseerd NaCl 0.9 (zie tabel XXXII) en ultrafiltraat (tabel XXXIII).

¹⁾ l. c.

TABEL XXXII.

Exsudaatleucocyten konijn. $\frac{1}{2}$ uur op 37° C. Sublimaatfixatie.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, die amyllum hebben opgenomen:
$\frac{1}{10}$ 1 serum + 9 NaCl 0.9	nagenoeg 100 %
$\frac{1}{10}$ 1 serum + 9 NaCl 0.9 (neutraal)	nagenoeg 100 %
$\frac{1}{20}$ 1 serum + 19 NaCl 0.9	$\frac{94}{120} = 78.3 \%$
$\frac{1}{20}$ 1 serum + 19 NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{151}{171} = 88.3 \%$
$\frac{1}{50}$ 1 serum + 49 NaCl 0.9	$\frac{50}{125} = 40 \%$
$\frac{1}{50}$ 1 serum + 49 NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{148}{201} = 73.4 \%$
$\frac{1}{100}$ 1 serum + 99 NaCl 0.9	$\frac{0}{107} = 0 \%$
$\frac{1}{100}$ 1 serum + 99 NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{17}{133} = 12.7 \%$
NaCl 0.9	$\frac{1}{140} = 0.7 \%$
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{11}{86} = 12.7 \%$

De serumwerking is in tabel XXXII schijnbaar tot in grotere verdunning zichtbaar in de geneutraliseerde vloeistof, maar in werkelijkheid is dit verschil niet grooter, dan de werking, die we zien tengevolge van het neutraliseeren der NaCl 0.9 alleen.

Ook op het ultrafiltraat heeft (zie tabel XXXIII) de toevoeging van een geringe hoeveelheid serum geen specifieke werking meer. Aan den anderen kant zien we, dat in deze proef de toevoeging van 2 % serum aan NaCl 0.9 juist remmend

werkt. Dit is een verschijnsel, dat ik vrij veelvuldig zag; de verklaring er van zal duidelijk worden na de bespreking van de nu volgende proeven.

TABEL XXXIII.

Ontleend aan dezelfde proef als tabel XIX.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal der leucocyten, die amyllum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	$\frac{21}{257} = 8.1 \%$
NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{50}$	$\frac{4}{230} = 1.7 \%$
Ultrafiltraat rund (neutraal)	$\frac{140}{359} = 39 \%$
Ultrafiltraat rund + serum $\frac{1}{50}$	$\frac{138}{331} = 41.6 \%$
Serum 1 + 5 NaCl 0.9	$\frac{196}{252} = 77.7 \%$

rschil tus-
nen serum-
oudend en
serumvrij
lieu betref-
fende de
imum con-
centratie
ionen voor
optimum
agocytose.

Wij hebben n.l. gezien, dat in serumvrij milieu een optimum phagocytose tot stand komt bij een concentratie aan H-ionen, die overeenkomt met de neutrale reactie, en zeer snel daalt, als die concentratie verder afneemt tot de alkalische reactie. In serum daarentegen en ook in de meer geconcentreerde serumverduningen is de reactie duidelijk aan de alkalische kant, en toch vinden we hier een maximum phagocytose, hoewel bv. een serumverduning $\frac{1}{10}$ neutraalrood nog vrijwel geel tint. De gevoeligheid voor schommelingen in het aantal H-ionen naar de alkalische kant wordt dus kleiner, daarentegen wordt zij, zooals we nu zullen zien, naar de zure kant duidelijk grooter. Wanneer we door ultrafiltraat, bij welks alkalische

TABEL XXXIV.

Eerste inspuiting 3 dagen geleden. 40 min. op 30° C. Formol- en sublimaatfixatie.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, die amyllum hebben opgenomen:
Serum	$\frac{217}{301} = 72\%$
Serum + CO ₂	$\frac{172}{363} = 47.3\%$
Serum $\frac{1}{2}$	$\frac{172}{321} = 53.5\%$
Serum $\frac{1}{2}$ + CO ₂	$\frac{72}{281} = 25.6\%$
Serum $\frac{1}{4}$	$\frac{159}{276} = 57.6\%$
Serum $\frac{1}{4}$ + CO ₂	$\frac{5}{221} = 2.2\%$
Serum $\frac{1}{8}$	$\frac{97}{227} = 42.7\%$
Serum $\frac{1}{8}$ + CO ₂	$\frac{6}{257} = 2.3\%$
Serum $\frac{1}{20}$	$\frac{52}{243} = 21.4\%$
Serum $\frac{1}{20}$ + CO ₂	$\frac{1}{180} = 0.6\%$

reactie vrijwel elke phagocytose ontbreekt, koolzuur leiden, totdat de reactie neutraal of zelfs eenigszins zuur is, dan stijgt de phagocytose aanmerkelijk. Gaan we nu evenwel op dezelfde wijze koolzuur leiden door serum of serumverduunningen, dan zien we de phagocytose teruggaan, in onverdund serum slechts weinig, in serumverduunningen daarentegen zeer snel. Duidelijk blijkt dit uit tabel XXXIV. Reeds als het serum viermaal met

TABEL XXXV.

Leucocyten verkregen na een verblijf van 6 uur in de buikholte; 30 min. op 33° C.; afkoeling; sublimatefixatie.

De kleur, welke de onderzochte vloeistoffen geven met neutraalrood, is in de tabel ingelascht; hierbij zijn die, welke ongeveer gelijke tinten geven door HCl toevoeging en door CO₂ doorleiding, steeds bij elkaar geplaatst. Van HCl werden toegevoegd verschillende hoeveelheden n/10 HCl, de koolzuurleiding werd telkens zoolang voortgezet, tot de beoogde tinten waren verkregen.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Kleur der vloeistoffen met neutraalrood:	Procentgetal der leucocyten, die amylum hebben opgenomen:
Serum $\frac{1}{6}$ (1 serum op 5 NaCl 0.9)	geel	$\frac{164}{249} = 65.8\%$
Serum 1 + 5 ultrafiltraat	geel	$\frac{166}{304} = 54.6\%$
Serum 1 + 5 ultrafiltraat + CO ₂	oranjerood	$\frac{162}{236} = 68.8\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + HCl $\frac{n}{175}$	rood	$\frac{0}{209} = 0\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + HCl $\frac{n}{200}$	roserood	$\frac{147}{266} = 55.2\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + CO ₂		$\frac{161}{325} = 49.5\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + HCl $\frac{n}{250}$	roserood met iets oranjetint	$\frac{177}{280} = 63.2\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + CO ₂		$\frac{178}{316} = 56.3\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + HCl $\frac{n}{375}$	oranje tot oranjerood	$\frac{163}{242} = 67.3\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + CO ₂		$\frac{158}{245} = 64.5\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + CO ₂	nagenoeg rood	$\frac{107}{271} = 39.4\%$

NaCl 0.9 is verdund wordt tengevolge van het doorleiden van CO₂ de phagocytose tot nul teruggebracht, terwijl zij ook in

het onverdunde serum en het tot op de helft verdunde niet onbelangrijk is afgenomen.

Slechts zeer zelden was deze afname onder invloed van CO_2 minder sterk. Dit was b.v. het geval in de proef, weergegeven in tabel XXXV, welke tevens doet zien, dat er alle aanleiding is, om de werking der koolzuurdoorleiding geheel te zoeken in verhooging van het aantal H-ionen, en niet in een specifieke CO_2 werking; immers wanneer ik met elkaar vergeleek verschillende concentraties H-ionen (blijkende uit de kleur met neutraalrood), eensdeels veroorzaakt door toevoeging van verschillende hoeveelheden HCl, aan den anderen kant door doorleiden van verschillende hoeveelheden koolzuur, begon de daling der phagocytose in beide gevallen bij precies dezelfde tint van het neutraalrood.

Behalve de overeenkomst tusschen CO_2 en HCl blijkt verder nog, dat het totale verdwijnen der phagocytose vrij plotseling komt, tusschen een toegevoegde hoeveelheid van n 200 en n 175 HCl. Verder zien we, dat deze remmende CO_2 werking alleen tot uiting komt, als de blokwerking van het serum onvoldoende is, een aanwijzing te meer, dat het hier een werking der H-ionen is. Immers nemen we onverdund serum (tabel XXXIV) of ultrafiltraat met serum verdund (tabel XXXV), dan is de koolzuurdoorleiding veel minder of zelfs in het geheel niet nadeelig voor de phagocytose; tevens is hier de blokwerking veel sterker, zoodat zelfs door veel koolzuur slechts een oranjeroode tint komt.

Hierin ligt nu meteen de verklaring, waarom soms serum $1/50$ een lagere phagocytose van amyllum geeft dan zuivere NaCl 0.9; de blokwerking van het serum is in deze verdunning totaal onvoldoende om de te hooge aciditeit te blokkeeren, en omgekeerd zal bij deze aciditeit een zeer geringe phagocytose te

TABEL XXXVI.

Versche paardenleucocyten. 30 min. op 37° C.

Vloeistoffen, welke op de leucocyten hebben ingewerkt:	Kleur der vloeistoffen met neutraalrood:	Procentgehalte der leucocyten, welke amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	rood	$\frac{22}{190} = 11.6\%$
Serum—NaCl 0.9 $\frac{1}{5}$	geel	$\frac{130}{153} = 84.9\%$
Serum—NaCl 0.9 $\frac{1}{5} + \text{CO}_2$	rose, iets oranje tint	$\frac{142}{168} = 84.5\%$
Serum—NaCl 0.9 $\frac{1}{20}$	rose oranje	$\frac{212}{264} = 80.3\%$
Serum—NaCl 0.9 $\frac{1}{20} + \text{CO}_2$	rood	$\frac{2}{282} = 0.7\%$
Ultrafiltraat	geel	$\frac{4}{146} = 2.7\%$
Ultrafiltraat + CO_2	rose oranje	$\frac{28}{186} = 15\%$
Serum—ultrafiltraat $\frac{1}{5}$	geel	$\frac{145}{174} = 83.3\%$
Serum—ultrafiltraat $\frac{1}{5} + \text{CO}_2$	rose oranje	$\frac{121}{145} = 83.4\%$
Serum—ultrafiltraat $\frac{1}{20}$	geel	$\frac{168}{205} = 81.9\%$
Serum—ultrafiltraat $\frac{1}{20} + \text{CO}_2$	rose oranje	$\frac{143}{178} = 80.3\%$

voorschijn treden, precies alsof door het verdunde serum koolzuur was geleid. Ook dan kreeg ik in sterkere serum-verdunningen, b.v. serum $\frac{1}{20}$, vaak een phagocytose lager dan die in NaCl 0.9. Die *remmende werking* onder invloed van de serumverdunning heeft dus ter zijner verklaring absoluut niet een afzonderlijke remmende stof noodig, maar zij ligt eenvoudig hieraan, dat de phagocytose zich bij aanwezigheid der serum-colloïden instelt op een ander niveau van H-ionen concentratie.

Het is zeer wel mogelijk, dat ook voor verschillende diersoorten en voor verschillende toestanden der leucocyten dit niveau op verschillende hoogte ligt, zoodat dit b.v. een verklaring zou kunnen geven voor de zeer uiteenlopende phagocytose, welke we vonden voor varkens-, konijnen- en paardenleucocyten in ongeveer geneutraliseerd ultrafiltraat.

Dat werkelijk de koolzuurdoorleiding bij verschillende leucocyten verschillende uitwerking heeft op de phagocytose, bleek me, toen ik de bloedleucocyten van het paard in dezelfde richting onderzocht (zie tabel XXXVI).

Hier zien we in het vijfmaal met NaCl 0.9 verdunde serum absoluut geen teruggang der phagocytose onder den invloed van CO₂ doorleiding, wel daarentegen in de 20-voudige verdunning, welke zonder CO₂ doorleiding ongeveer juist neutraal reageert. De doorleiding van CO₂ door dezelfde serumverduunningen met ultrafiltraat heeft absoluut geen effect.

Ten duidelijkste blijkt hier wederom de relatieve teruggang der phagocytose in serum—NaCl 0.9% + CO₂ tegenover zuiver NaCl 0.9%.

Op grond van de tot nu toe verkregen gegevens kunnen we dus zeggen, dat men zelden of nooit kan spreken van een bepaalden invloed van een zekere stof op de phagocytose; een geringe verandering in het milieu zal de werking geheel kunnen omkeeren. Zij zijn dus een steun voor de opvatting, dat de phagocytose is in de eerste plaats een resultaat van de werking van oppervlakteprocessen, welke, zooals bekend, ook door geringe wijzigingen kunnen omkeeren.

In dit verband kan ik hier nog wijzen op de onderzoeken van RADSMÄ ¹⁾, die aantoonde, dat zoowel de agglutinatie van

¹⁾ W. RADSMA: Dissertatie 1919, Groningen.

roode bloedlichaampjes als ook de phagocytose volgens de reeks van HOFMEISTER den invloed ondergingen van verschillende zoutoplossingen.

c) *Proeven over de werking, die het milieu op den duur heeft op de mogelijkheid van het tot stand komen van phagocytose.*

Heeft nu de toestand, waarin de leucocyt verkeert, op de phagocytose in het geheel geen invloed? Zooals reeds vroeger is opgemerkt is dit niet denkbaar, juist als men den grooten invloed van oppervlakteprocessen aanneemt, omdat de cel die oppervlakteprocessen kan wijzigen, zoo goed als ook er zelf door gewijzigd worden. Verschillende der voorafgaande proeven geven van dien invloed van de toestand der cel reeds een aanwijzing, b.v. de verandering in den invloed van CaCl_2 op de phagocytose, die optreedt, naarmate we met verschillende soorten exsudaatleucocyten van het konijn te doen hebben; de wisselende phagocytose van paardenleucocyten in ultrafiltraat, al naarmate deze leucocyten versch zijn, dan wel eenige dagen buiten het lichaam zijn geweest.

Nu is de levende cel tot op zekere hoogte een in zich zelf afgesloten geheel; het omgevende milieu en ook het object van phagocytose zijn van alle kanten toegankelijk, en zullen dus prompt op elke aangebrachte verandering reageeren; een *momentane verandering in phagocytose*, welke het leven der cel intact laat, zal dus vaak moeten teruggebracht worden tot zulk een werking op milieu of object van phagocytose of de grenslaag tusschen milieu en leucocyt, terwijl voorloopig de cel tot op zekere hoogte nog het constante element vormt. In deze richting doordenkende, komt men evenwel tot de slotsom, dat de toestand van de cel zelf zich op den duur ook onder invloed van het milieu zal wijzigen, en dat dan die veranderde

cel ook een veranderde phagocytose zal te zien geven. Zoo had ik b.v. reeds veel vroeger gezien, dat leucocyten van het paard, die langen tijd in NaCl 0.9 hebben gestaan, niet meer kool kunnen opnemen ¹⁾; dit als uiting van een dergelijke *duurwerking*. Nu is NaCl 0.9 een verre van physiologisch milieu, maar ook geringere wijzigingen in de omgevende vloeistof zullen op den duur een constante verandering in den aard der leucocyten moeten bewerken. Ik dacht, dat het verblijf der exsudaatcellen in de buikholte van het konijn zulk een verandering teweegbracht, die zich uitte in een veranderende phagocytose.

Deze langzame wijziging heb ik nu verder buiten het lichaam nagebootst en voortgezet, door de exsudaatleucocyten in vitro geruimen tijd in verschillend milieu te laten, en ze daarna alle in éénzelfde milieu op hun vermogen tot phagocytose te onderzoeken. Ik koos verschillende betrekkelijk physiologische vloeistoffen, zooals serum, NaCl 0.9, ultrafiltraat, inwerkende bij verschillende temperaturen, n.l. 0° en 37° C. Mijn gedachten-gang was daarbij de volgende: ik was tot het vermoeden gekomen, dat de witte bloedlichaampjes in de buikholte snel te gronde gaan, waarvan de langzaam veranderende phagocytose o.a. een uiting zou zijn: dat wil dus zeggen, dat de stofwisseling dezer cellen onder invloed van gewijzigde, niet varieerende omstandigheden irreversibel in één richting gaat. Nemen we deze leucocyten nu uit de buikholte in een zeker stadium, is het dan mogelijk om de omstandigheden tijdelijk zóó te wijzigen, dat dit proces, dat in gang is, wordt verlangzaamd, versneld of eventueel wordt omgekeerd of beter gezegd, teruggaat? Als één van deze milieu's koos ik bloedserum van dezelfde diersoort, als waarvan de leucocyten afkomstig waren,

¹⁾ Zie H. J. HAMBURGER, l. c., p. 84.

teneinde de bloedlichaampjes wederom zoo goed mogelijk het milieu te verschaffen, waarin ze ook in het bloed verkeerden, en dat ze in de buikholt misten; immers de vloeistof in de buikholt wijkt o.a. door een zesmaal kleiner eiwitgehalte van het bloedserum af. Verder mag worden aangenomen, dat elk levensproces der cel, in welke richting ook, bij een temperatuur van 37° zal worden versneld en bij 0° tot een minimum zal teruggaan, en zoo kon ik dus, door die twee uiterste temperaturen te kiezen, de grootste tegenstellingen verwachten. Als milieu, waarin ten slotte de phagocytose werd nagegaan koos ik NaCl 0.9, NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0125, en serum, zesmaal verdund met NaCl 0.9. De proeven geschieden niet onder inachtnaam van steriliteitsvoorzorgen. De inwerking op 37° werd daarom beperkt tot enkele uren, ten einde een eventueele schadelijke bacteriewerking met vrij groote zekerheid te kunnen uitsluiten.

De gevolgde methode wordt misschien het best verduidelijkt als ik deze eerst aan de hand van een der proeven bespreek:

De leucocyten zijn na herhaalde injecties gedurende twee dagen uit de buikholt van het konijn genomen; ze hebben daarna, met citras natricus vermengd, gedurende één nacht op een temp. van 0° gestaan; daarna wordt de suspensie op de gewone wijze driemaal uitgewasschen met NaCl 0.9 $\frac{0}{10}$; van de zóó verkregen leucocyten wordt ten eerste het phagocytosevermogen t. o. v. amyllum bepaald in NaCl 0.9, in NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0125 (neutraal) en in serum $\frac{1}{10}$, de laatste oplossing als het milieu, waarin leucocyten bijna steeds goed phagocyteeren.

Van de rest der suspensie worden nu twee gelijke porties gevoegd bij telkens 10 cc NaCl 0.9, en twee andere bij telkens 10 cc konijneserum, alle vier in buisjes met ingeslepen glazen stop, zooals ook voor phagocytoseproeven worden gebruikt. Eén „NaCl 0.9” — en één „serum”buisje wordt direct op 0° geplaatst, de twee andere gedurende ongeveer 3 uur eerst op 30° (een temp. van 37° C. was in de thermostaat niet te verkrijgen wegens onvoldoende gasdruk) en daarna eveneens op 0° , waar alle vier buisjes verder tot den volgenden dag bleven.

Den volgenden dag worden alle vier snel $3 \times$ uitgewasschen met NaCl 0.9, en daarna wederom onderzocht op phagocytose van amylum in NaCl 0.9, NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0125 (neutraal) (in de eerste proef weggelaten) en serum, zesmaal verdund met NaCl 0.9. Expositietijd 45 min. op 37° ; daarna fixatie (zie tabel XXXVII).

TABEL XXXVII.

De leucocyten werden blootgesteld aan de inwerking van:	Het vermogen tot phagocytose onderzocht in:	Procentgetal der leucocyten, welke amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9 bij een temp. van 0° , gedurende 24 uur	NaCl 0.9	$\frac{0}{215} = 0\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{48}{252} = 19\%$
NaCl 0.9 bij een temp. van 30° gedurende 3 uur, daarna bij 0° gedurende 21 uur	NaCl 0.9	$\frac{0}{165} = 0\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{16}{160} = 10\%$
Serum bij een temp. van 0° gedurende 24 uur	NaCl 0.9	$\frac{5}{297} = 1.6\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{134}{235} = 57\%$
Serum bij een temp. van 30° gedurende 3 uur, daarna bij 0° gedurende 21 uur	NaCl 0.9	$\frac{17}{244} = 6.9\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{215}{264} = 81.4\%$
Direct onderzocht	NaCl 0.9	$\frac{0}{320} = 0\%$
	NaCl 0.9 + CaCl_2 0.0125 (neutraal)	$\frac{24}{186} = 12.9\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{108}{161} = 61.9\%$

Het resultaat is zeer frappant: de leucocyten, die bij den aanvang der proef een phagocytose te zien geven in NaCl 0.9 van 0% , en in serum van 61.9% , verliezen dit vermogen tot phagocyteeren in serum $\frac{1}{6}$ bijna geheel na een verblijf van 24

uur in NaCl 0.9 op een temperatuur van 0° , en nog meer, wanneer in ditzelfde milieu de temperatuur gedurende de eerste drie uren op 30° C. werd gehouden. Daarentegen blijft het vermogen tot phagocytose hetzelfde, als de leucocyten 24 uur in serum op 0° blijven, en gaat het omgekeerd zelfs duidelijk stijgen, wanneer ook in serum drie uur lang de temp. op 30° C. wordt gehouden.

Deze verschijnselen vinden een logische verklaring, als we aannemen, dat in het milieu NaCl 0.9 de regressieve verandering der leucocyten, welke reeds in de buikholte was aangevangen, nu verder voortschrijdt; bij hogere temperatuur wordt dit proces versneld; dat daarentegen dezelfde verandering tot stilstand komt in het milieu serum bij een temp. van 0° , en in ditzelfde milieu zelfs weer teruggaat in omgekeerde richting, als we in het serum een tijdlang een hogere temperatuur onderhouden. Dit laatste lijkt me van de grootste beteekenis: *immers we zien hier aan de phagocytose gedemonstreerd, dat we leucocyten, die uit het lichaam komen, buiten het lichaam door een doelmatig milieu en bij doelmatige temperatuur, in een beteren toestand kunnen brengen, dan waarin ze in het lichaam verkeerden. Dat hiervoor een hogere temperatuur noodig is, wijst er wel op, dat een stofwisselingsproces hieraan ten grondslag ligt.* Onder deze omstandigheden kunnen de leucocyten zelfs in NaCl 0.9 weer amyllum opnemen, zij het ook in geringe mate.

De volgende proef (tabel XXXVIII) geeft een geheel analoog resultaat. De voorbehandeling der leucocyten, welke naar schatting ongeveer 16 uur in de buikholte hadden vertoefd, was precies dezelfde, als in de vorige proef; alleen werden zij direct na het uithalen uit de buikholte verder behandeld; ook werd nu niet NaCl 0.9 gebruikt voor inwerking bij hogere temperatuur, maar serum $\frac{1}{6}$, waardoor iets CO_2 was gevoerd.

TABEL XXXVIII.

De leucocyten werden blootgesteld aan de inwerking van:	Het vermogen tot phagocytose onderzocht in:	Procentgetal der leucocyten, die amylum hebben opgenomen:
Direct onderzocht	NaCl 0.9	$\frac{0}{230} = 0.9\%$
	NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125	$\frac{43}{364} = 11.8\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{132}{250} = 52.8\%$
NaCl 0.9 bij een temp. van 0° C. gedurende 24 uur	NaCl 0.9	$\frac{0}{165} = 0\%$
	NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125	$\frac{0}{211} = 0\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{11}{149} = 7.3\%$
Serum $\frac{1}{6}$ + CO ₂ bij een temperatuur van 30° C. ge- durende 2½ uur, daarna bij 0° C. gedurende 21 uur	NaCl 0.9	$\frac{0}{191} = 0\%$
	NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125	$\frac{0}{217} = 0\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{10}{139} = 7.1\%$
Serum bij een temp. van 0° C. gedurende 24 uur	NaCl 0.9	$\frac{0}{195} = 0\%$
	NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125	$\frac{2}{186} = 1\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{43}{111} = 38.9\%$
Serum bij een temperatuur van 30° C. gedurende 2½ uur, daarna bij 0° C. gedu- rende 21 uur	NaCl 0.9	$\frac{14}{234} = 6\%$
	NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.0125	$\frac{71}{234} = 30.3\%$
	Serum $\frac{1}{6}$	$\frac{147}{197} = 74.6\%$

Op andere proeven in denzelfden zin, waarbij o.a. ook ultrafiltraat met en zonder serumtoevoeging werden onderzocht, kom ik in hoofdstuk IV nog terug; ze gaven eveneens als resultaat, dat alleen in serum de leucocyten dusdanig veranderd worden, dat een veel sterkere phagocytose er het gevolg van is.

De enkele aangehaalde proeven heb ik reeds nu vermeld, alleen om te doen zien, dat verschillende milieu's op den duur de leucocyten kunnen wijzigen, zoodat deze daarna in éézelfde oplossing een verschillende phagocytose te zien geven. Deze inwerking zal evenwel, als de leucocyt levend blijft, meestal een zekeren tijd noodig hebben; heeft toevoeging van een dergelijk milieu momentaan een sterken invloed op de phagocytose, dan zal dit de uiting van een oppervlakteproces zijn.

Ik beschik nog over enkele onderzoekingen, betreffende het vermogen, amyllum te phagocyteeren, van leucocyten, afkomstig uit menschelijke pus; deze leucocyten hadden steeds een gedegenereerd voorkomen en zijn eenigermate te vergelijken met mijne exsudaatleucocyten van het konijn. In NaCl 0.9 was de phagocytose steeds nul; door toevoeging van menschen-serum evenwel tot een concentratie van $\frac{1}{8}$ zien we bij deze cellen, die uit een reeds 15 dagen oud absces afkomstig waren, de phagocytose weer opgevoerd tot meer dan 50 %, blijkens het onderstaande resultaat:

NaCl 0.9	$\frac{0}{319} = 0 \%$
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.015 (neutraal)	$\frac{4}{230} = 1.7 \%$
Gewijzigde Ringer	$\frac{7}{222} = 3.1 \%$
Serum $\frac{1}{8}$	$\frac{97}{182} = 53.2 \%$

Afgaande op de phagocytose moeten we dus onderstellen, dat deze exsudaatcellen, ondanks hun ouderdom, voor een groot gedeelte nog in levenden toestand verkeerden.

Alvorens hierop nader in te gaan, wil ik in de volgende hoofdstukken eenige andere eigenschappen van het witte bloed-lichaampje nagaan, en wel in de eerste plaats die, welke met de phagocytose gewoonlijk in één adem genoemd wordt, n.l. de *amoëboïde bewegelijkheid*.

HOOFDSTUK II.

AMOEBOIDE BEWEGELIJKHEID EN PHAGOCYTOSE.

1. BESCHOUWING OVER DE KRACHTEN, WELKE BEIDE PROCESSEN BEINVLOEDEN.

Amoeboide bewegelijkheid en phagocytose vindt men regelmatig te zamen aanwezig als eigenschappen van bepaalde cellen, en wel van niet in verband levende cellen; het voorbeeld van het eencellige, vrij levende organisme, dat uitloopers uitzendt, en met deze uitloopers vreemde partikeltjes omvloeit en in zich opneemt, is overbekend. Langen tijd heeft men amoeboide bewegelijkheid en phagocytose zelfs eenigermate vereenzelvigd in dien zin, dat men dacht, dat de amoeboide beweging een noodzakelijke voorwaarde was, zonder welke geen noemenswaarde phagocytose plaats had. Wanneer men evenwel de krachten nagaat, waarop beide verschijnselen berusten, vindt men naast een zekere mate van overeenkomst ook groote verschillen. Het is vooral RHUMBLER ¹⁾ geweest, die beide vraagstukken heeft bestudeerd in samenhang met elkaar, en den nadruk gelegd op den overwegenden invloed, die bepaalde physische factoren, n.l. oppervlaktespanningen, hierbij moeten uitoefenen. Vóór hem hadden reeds verschillende andere onderzoekers ter verklaring van eigenbewegingen van het protoplasma spanningsverhoudingen ten opzichte van de

¹⁾ 1. c.

omgeving te hulp geroepen; de eerste van deze was BERTHOLD ¹⁾, die op deze wijze de protoplasmastroomingen in plantencellen verklaarde. QUINCKE ²⁾ ging uit van het feit dat levenloos materiaal bewegingen kan vertoonen, die een groote analogie vertoonen met protoplasmabewegingen; hij had het oog op de bewegingen, welke een oliedruppel in een alkalische oplossing uitvoert, onder voortdurende zeepvorming, en nam nu aan, dat het protoplasma op overeenkomstige wijze olie bevat, welke voortdurend zeepen levert, waarvan de wisselende oppervlaktenspanningen het gevolg zouden zijn. BÜTSCHLI ³⁾ zoekt de verklaring in de schuimstructuur van het protoplasma, waarvan hij de bekende voorvechter is, en dacht zich nu deze bouw volgens het principe, waarop ook een druppel van een oliezeep-schuimemulsie is gebouwd, welke in water eveneens verschillende bewegingen uitvoert.

Een dergelijke volkomen analogie tusschen de ingewikkelde bouw van het protoplasma met dergelijke toevallige mengsels aan te nemen, is wel is waar al te eenvoudig, maar toch is het vinden van een zoo verregaande overeenkomst tusschen het geheimzinnige bewegingsverschijnsel van het levende protoplasma, en bekende verschijnselen aan levenloos materiaal van zeer veel waarde geweest, omdat daardoor aanknoopingspunten voor eene verklaring gegeven zijn.

De beide bovengenoemde onderzoekers zoeken nu evenwel de verklaring van de beweging, als van buiten op het protoplasma inwerkende, evenals de omgevende vloeistof op de

¹⁾ Studien über Protoplasmamechanik. Leipzig 1886.

²⁾ Annalen der Physik und Chemie. Neue Folge **35**, 580. 1888.

³⁾ Untersuchungen über microscopische Schäume und das Protoplasma. Leipzig 1892.

oliedruppel. De eerste die hierbij het voornaamste gewicht legde op de protoplasmamassa zelf, was RYDER ¹⁾, die elke bijzonderheid in den vorm van kern en protoplasma beschouwde als een gevolg van oppervlaktespanningsverhoudingen in het protoplasma veroorzaakt.

RHUMBLER heeft in een reeks van publicaties zijn oppervlaktespanningstheorie opgebouwd, waarbij hij, evenals BÜTSCHLI, staat op de basis, dat het protoplasma een schuimstructuur heeft; hij gebruikt hiervoor den term „heteromorph spumoid”. Hij tracht op grond van deze theorie alle vormveranderingen, welke cellen of groepen van cellen door verschillende invloeden kunnen ondergaan, te verklaren en onder één algemeen gezichtspunt te vereenigen. De schuimstructuur brengt mee, dat het celprotoplasma bestaat uit een groot aantal ruimten, waarvan de inhoud betrekkelijk dun vloeibaar is, en die van elkaar gescheiden zijn door een wand, die rijker aan colloïden en daardoor vaster is. Deze wand maakt, dat elk dezer ruimten tot op zekere hoogte een eigen leven voert, een leven, dat verder verschillend zal zijn, daar men zich den inhoud van al deze kamertjes verschillend kan denken. Verder moet men zich deze afdeelingen onderling zeer verschillend in grootte voorstellen, terwijl de grenzen, die men immers kan voorstellen als plaatsen, waar colloïden in meer gecondenseerden vorm zijn verdicht, voortdurend kunnen wisselen, ook al in verband met locale wisselingen in oppervlaktespanning. Door dezen gecompliceerden bouw wordt ook de buitenwand der cel tot datgene, wat ROUX bestempelde met den naam *anhomogeen*

¹⁾ RYDER, J. A. Dynamics in evolution. Biological lectures delivered at the Marine Biological Laboratory of Woods Holl, 1894. 63; geciteerd naar MACALLUM: Ergebnisse Physiologie, 1911, p. 598.

oppervlak. Nu zullen voortdurend, ook onder den invloed van de omgeving, aan het oppervlak en ook meer naar het centrum, zich processen kunnen voltrekken, die het kenmerk zijn van het leven der cel; daardoor zal de oppervlaktespanning aan den buitenwand gewijzigd worden, en daar verder deze processen aan verschillende gedeelten van het oppervlak verschillend kunnen zijn, zal de wijziging in de oppervlaktespanning op verschillende punten niet dezelfde zijn; is nu op bepaalde punten de oppervlaktespanning lager dan op andere, dan zal op deze punten een druk naar buiten worden uitgeoefend, m. a. w. het protoplasma zal daar worden uitgebocht naar buiten, en het begin van een pseudopodium is gevormd. Verder kan het daarbij komen tot zwelling of inkrimping van verschillende kamertjes onder osmotische invloeden. Een punt met verlaagde oppervlaktespanning zal een oogenblik later weer omgekeerd in tegenovergestelde omstandigheden kunnen verkeerden, waarbij de oppervlaktespanning verhoogd wordt, en het pseudopodium weer wordt ingetrokken, om misschien op een andere plaats weer te worden uitgestoken. We kunnen ons dus denken, dat physische en chemische invloeden in het celprotoplasma de beweging van de cel veroorzaken. Deze invloeden zullen evenwel tot op zekere hoogte van de omgeving afhankelijk zijn, en er vaak door worden te voorschijn geroepen of gewijzigd. Zoo vond b.v. VERWORN¹⁾, die ook de protoplasmabeweging uitvoerig heeft bestudeerd, dat door z.n. galvanotaxis onder den invloed van een potentiaalverschil de beweging in één richting kan worden geleid.

Electrische verschijnselen, berustend op de relatieve ondoorlaatbaarheid van de celwand en van de wanden van de kleine

¹⁾ Zie o.a. M. VERWORN: Pflüger's Archiv. 1897. Bd. 65 S. 47.

onderafdeelingen voor ionenverschuiving, zullen met elke wisseling in oppervlaktespanning verder hand in hand gaan.

Wanneer we nu de amoeboïde bewegelijkheid op grond van deze theorie beschouwen, en wel alleen de mogelijkheid van het protoplasma, van vorm te veranderen, voorloopig nog niet in verband met locomotie = verandering van plaats van de geheele cel, dan zal het uitsteken van protoplasmauitloopers kunnen plaats vinden midden in een vloeistof, die de cel rondom omgeeft.

Om evenwel hiermee een verandering van plaats gepaard te doen gaan, moet er een derde factor bijkomen, n.l. de onderlaag, die door bepaalde adhaesieverhoudingen het van vorm veranderende protoplasma den steun biedt, noodig voor de beweging. Behalve de oppervlaktespanning tusschen de beide vloeistoffen (leucocyt en medium) komt er nu een derde factor bij, n.l. de oppervlaktespanning tusschen deze beide afzonderlijk met de vaste onderlaag. Onderstellen we nu een oogenblik, dat deze onderlaag glas is, zooals wanneer b.v. een wit bloedlichaampje op een objectglas wordt bekeken. De leucocyt zal dan onafhankelijk van zijn amoeboïde bewegingen zich min of meer op het glas uitbreiden, zooals elke vloeistofdruppel, totdat er evenwicht tusschen de verschillende krachten is; krijgt hij daarbij amoeboïde bewegingen, dan zal hij bij een zekere (niet te groote) adhaesie aan de onderlaag zich over het glas kunnen voortbewegen; zijn er geen amoeboïde bewegingen of is b.v. de adhaesie aan het glas te sterk, dan komt het alleen tot een meer of minder sterke afplatting of uitbreiding van den leucocyt langs het glas, een vasthechting daaraan, en om deze op te heffen zal een grootere of een geringere kracht noodig zijn.

Dezelfde krachten zullen werkzaam zijn, als het derde voorwerp, waarmee de leucocyt in aanraking komt, niet is een glasplaat, maar b.v. een aantal kleine korreltjes, in grootte van de orde van den leucocyt of wat kleiner. Onder deze gewijzigde grootteverhoudingen zal het meer of minder vastkleven aan de vaste deeltjes den vorm aannemen van een nieuw verschijnsel, en wel het zal al of niet komen tot *phagocytose*. Onder bepaalde omstandigheden, n.l. als de adhaesie tusschen den leucocyt en het vaste partikeltje zeer sterk is, en de cohaesie, de inwendige wrijving van den leucocyt betrekkelijk gering, zal de oppervlakteuitbreiding langs de grens van beide, evenals zoeven op de glasplaat, zoo groot mogelijk zijn, d. w. z. er resulteert een kracht, welke maakt dat het vaste deeltje geheel door den leucocyt wordt omvloed, of in den leucocyt als 't ware gedrukt wordt. Is daarentegen de adhaesiekracht kleiner, of de inwendige wrijving van den leucocyt grooter, dan zal het slechts tot een zekere mate van aanhechting tusschen de twee voorwerpen komen; terwijl, als de adhaesie tusschen leucocyt en vloeibare omgeving het grootst is, het zelfs niet tot deze aanhechting zal komen. RHUMBLER drukt het zóó uit, dat een voor opname geschikt voorwerp aan de grens van twee vloeistoffen, die zich niet met elkaar mengen, door die vloeistof zal worden opgenomen, tot welke ze de grootste adhaesie bezit, mits deze adhaesie grooter is dan de cohaesie van de bedoelde vloeistof. Natuurlijk zal het op te nemen voorwerp zoowel vast als vloeibaar kunnen zijn.

Bij de opname van partikeltjes komt dus een factor in het spel, welke voor de amoeboïde beweging zelf buiten beschouwing kon blijven, n.l. de oppervlaktewerking van het derde oppervlak; aan den anderen kant komt bij de vraag, of er mogelijkheid tot *phagocytose* bestaat, slechts de bepaalde verhouding der

oppervlaktespanningen ter sprake, niet een wisseling daarvan, zooals bij de amoeboïde beweging; een vastzittende cel zal zeer goed kunnen opnemen, en omgekeerd een zich sterk amoeboïde bewegende cel onder bepaalde omstandigheden absoluut niet phagocyteeren.

Hiermee is evenwel niet gezegd, dat de amoeboïde bewegelijkheid van de cel absoluut geen beteekenis heeft voor de mate, waarin deze cel kan phagocyteeren; men kent deze laatste eigenschap toch vooral bij de vrij bewegende cellen; de stofwisselingsprocessen, welke aan de amoeboïde bewegelijkheid ten grondslag liggen, zullen door de wisselingen in oppervlaktespanningen welke er het gevolg van zijn, zeer zeker ook de phagocytosemogelijkheden kunnen beïnvloeden, zooals reeds in het vorige hoofdstuk (p. 39) is uiteengezet.

Over den aard van de besproken stofwisselingsprocessen tasten we nog geheel in het duister; we weten er niets van waardoor ten slotte de opeenvolging van de *contractiephase* en de *expansiephase* plaats heeft, waarin we de amoeboïde beweging kunnen analyseeren. Volgens VERWORN¹⁾ zou het de zuurstofopname zijn, welke de locale vermindering der oppervlaktespanning te weeg brengt, waarvan pseudopodienvorming het gevolg zou zijn; het daarop volgende oxydatieve uiteenvallen zou de contractiephase inleiden. Deze theorie kon evenwel niet worden volgehouden, toen bleek, dat de amoeboïde bewegelijkheid nog zeer langen tijd onverminderd blijft bestaan, ook als de vrije zuurstof geheel ontbreekt. (W. KÜHNE²⁾). Van een directen invloed van vrije zuurstof moet men dus afzien; maar ook dan kan men zich nog zeer goed denken, dat opeenvolgende

1) M. VERWORN: Die Bewegung der lebendigen Substanz 1892.

2) Zeitschr. f. Biologie 1897, Bd. 35 en 1898, Bd. 36.

processen van *assimilatie* en *dissimilatie*, van vermindering en van vermeerdering van het aantal moleculen, zooals JENSEN ¹⁾ het uitdrukt, achtereenvolgens de stadia van expansie en van contractie veroorzaken. BIEDERMANN ²⁾ is van oordeel, dat de verschillende fasen van de protoplasmabeweging zich evenwel lang niet altijd dekken met de genoemde stofwisselingsprocessen, en meent, dat het voorloopig nog onmogelijk zal blijven, den naderen aard der chemische processen te doorgronden. Overigens zijn de nieuwere onderzoekers het er toch vrijwel unaniem over eens, dat oppervlakteverhoudingen, veroorzaakt door chemische processen, hier een hoofdrol spelen. Als tegenhanger vermeld ik alleen de meening van ULLMANN ³⁾, die de merkwaardige eigenschap der leucocyten, om steeds weer het doel van hun werkzaamheid te vinden, verklaart, door aan de cel als 't ware een celziel toe te kennen; die cel heeft gevoel, ruikt het spoor van zijn prooi. ULLMANN vindt dan ook alle pogingen, om de werkzaamheid dezer cellen op eenvoudige wetten te baseeren, volkomen waardeloos en doelloos.

Terugkomend op het verschil tusschen amoeboïde bewegelijkheid en het phagocytoseproces, zal er op grond van de theorie van RHUMBLER dus zeer goed phagocytose plaats kunnen hebben in een cel, die chemisch in een rusttoestand verkeert, en zich dus niet amoeboïd beweegt, en omgekeerd de cel zeer actief kunnen zijn, zich uitende in een sterke amoeboïde beweging, en daarbij toch de verhouding der oppervlakte-spanningen niet van dien aard, dat opname van partikeltjes plaats heeft.

¹⁾ Zie o. a. *Ergebnisse der Physiologie* 1902 1^{II}.

²⁾ *Erg. Physiol.* 1909.

³⁾ *VIRCHOW'S Archiv.* 205. p. 203.

De door mij en anderen in dit laboratorium verrichte onderzoekingen leveren in ruime mate materiaal op, om deze verschillende mogelijkheden te illustreeren. Voordat ik er evenwel toe overga, hiervan eenige voorbeelden te noemen, moet ik eerst nog stilstaan bij de methodes, welke men kan bezigen, om de amoeboïde bewegelijkheid te constateeren.

2. METHODEN TOT HET NAGAAN VAN DE AMOEBOÏDE BEWEGELIJKHEID.

Meestal gebruikt men hiervoor het zien voortkruipen van de cel onder het dekglas. Uitmuntend leent zich voor dit doel de methode van DEETJEN, met de wijziging zooals die door WEIDENREICH ¹⁾ wordt vermeld: een 1 % oplossing van agar-agar in 0.8 % opl. van NaCl, wordt heet uitgegoten op een vlakke glasplaat, en hiervan, nadat de laag gestold is, dunne reepen losgesneden; deze legt men omgekeerd op een objectglas, hierop een druppel van het te onderzoeken materiaal en vervolgens dekt men alles toe met een dekglas, dat buiten den rand van de agarschijf uitsteekt; noemenswaarde verdamping is hierbij uitgesloten. Ik kreeg nog beter resultaten, als ik de concentratie van de agaroplossing iets sterker nam, waardoor de gestolde laag steviger en beter te hanteeren wordt.

Op deze wijze kon ik op zeer fraaie wijze de amoeboïde beweging van paardeleucocyten in bloedserum van het paard nagaan. Het bleek daarbij, dat niet alleen de neutrophiele leucocyten, maar nog sterker de eosinophiele, zich zeer duidelijk amoeboïd bewegen; met de temperatuur wordt de snelheid van voortbeweging grooter; de eosinophiele cellen bewegen zich

¹⁾ WEIDENREICH: Die Leucozyten und verwandte Zellformen. Wiesbaden 1911.

sneller en met dikke ronde hyaline uitloopers; de cel rekt zich als het ware uit en wordt cilindrisch, in het cilindrische uitsteeksel volgen de groote eosinophile korrels; de neutrophiele cellen bewegen zich met veel fijner vertakte uitloopers. Opmerking verdient nog, dat phagocytose van kool onder deze omstandigheden nagenoeg niet plaats vond; de kooldeeltjes werden wel aangeraakt, soms gedeeltelijk omvat, maar niet opgenomen, en dat terwijl dezelfde leucocyten in hetzelfde milieu in een proefbuisje tot ruim 40 % phagocyteerden. Klaarblijkelijk is hiervan de oorzaak te zoeken in oppervlaktewerkingen, welke de agarplaat op kool en leucocyt uitoefent.

Deze methode, om de beweging der cellen na te gaan, heeft evenwel het nadeel, dat hierbij de zuivere bewegelijkheid niet altijd tot uiting behoeft te komen; immers, zooals reeds eerder is uiteengezet (p. 89), zal hier de oppervlaktewerking van de onderlaag storend kunnen werken. In een bepaalde vloeistof, waarin de cel wel uitloopers uitsteekt, zal zij toch hierdoor op het dekglas onbewegelijk kunnen blijven; het voortbewegen is dus wel een bewijs van amoeboïde bewegelijkheid, als zij aanwezig is; afwezigheid evenwel sluit niet uit, dat de cel, als ze geheel vrij was, toch heel goed pseudopodien zou kunnen vormen.

Een meer zuivere maat van de amoeboïde bewegelijkheid geeft daarom m.i. de tweede methode, waarbij de cel in den toestand, waarin zij verkeert, momentaan wordt gefixeerd.

Ook deze methode is reeds veelvuldig gebruikt om de celuitloopers vast te leggen. WEIDENREICH ¹⁾ beveelt hiervoor osmiumzuurdampen aan, SCHÄFER ²⁾ gebruikt wel de fixatie

¹⁾ l. c.

²⁾ Essentials of Histology.

door stoom. Kort geleden beveelt ook M. A. VAN HERWERDEN¹⁾ de fixatiemethode warm aan; door fixatie met formoldampen op 37° C. kreeg zij zelfs duidelijke pseudopodien aan lymfocyten en bloedplaatjes.

Zelf heb ik dergelijke fixatiemiddelen oorspronkelijk voor enkele jaren gebruikt, met het doel, om den toestand van phagocytose, waarin de cel verkeert, te kunnen vastleggen (zie Methodiek p. 12) en om te voorkomen, dat de (nog levende) leucocyten, onder het dekglas gebracht, zich gingen uitspreiden, en daardoor nagenoeg onzichtbaar werden, als gevolg van den boven besproken evenwichtstoestand, die er intreedt tusschen de spanningsverhoudingen van glas, medium en leucocyt. De gefixeerde cel doet dit laatste niet meer, en de phagocytose is, ook bij hooger temperatuur, onmiddelijk stop gezet.

Ik fixeerte eenvoudig, door aan de leucocytenbuisjes 1 à 2 druppels van een 1—2% oplossing van osmiumzuur toe te voegen. Dat hierbij werkelijk de leucocyten worden vastgelegd in den toestand waarin ze verkeerden, bleek me, door de cellen vóór en na het fixeeren te vergelijken; in beide gevallen was de celvorm precies dezelfde. Ook formol (een paar druppels van een 10% oplossing) leent zich voor hetzelfde doel, vooral in sterk eiwithoudende milieu's; in eiwitvrije milieu's geeft formol volgens mijne ervaring vaak sterke vervorming der cel door schrompelingsprocessen.

Hoewel ik deze methode dus aanvankelijk met een geheel andere bedoeling gebruikte, moest het mij wel opvallen, dat in verschillende milieu's de zoo gefixeerde cellen sterke amoëboide uitloopers vertoonden. *Het voorkomen van de momentaan gefixeerde cellen moet dus een afspiegeling zijn van hunne*

¹⁾ Ned. Tijdschr. v. Gen. 1919 II, p. 170.

amoëboïde bewegelijkheid, en dientengevolge van protoplasma-wijzigingen in een bepaald medium, gezien het verband tusschen pseudopodienvorming en protoplasmawisselingen. Dit geldt natuurlijk alleen, wanneer er, zooals met osmiumzuur, gesproken kan worden van een onveranderde vastlegging van den vorm der cel. Men zou anders deze gefixeerde uitloopers kunstproducten kunnen noemen, ontstaan in de onder invloed van het fixatiemiddel afstervende cel. Een dergelijk optreden van uitloopers onder invloed van het afsterven zag HABERLANDT ¹⁾ een enkele maal bij kikkerbloedlichaampjes, welke hij buiten het lichaam cultiveerde, hoewel de cellen bij het langzaam afsterven meest weer den bolvorm aannemen.

3. VERBAND TUSSEN AMOEBOÏDE BEWEGELIJKHEID EN PHAGOCYTOSE.

Wanneer we nu nagaan, welk verband we, afgaande op deze fixatiemethode, tusschen de amoëboïde bewegelijkheid en de intensiteit van de phagocytose konden aantoonen, dan bleek er van dit verband in de meeste gevallen slechts zeer weinig, zooals ook, afgaande op de boven ontwikkelde theorie, te verwachten was. In talrijke gevallen gingen beide samen, maar nog veel vaker leken beide geheel van elkaar onafhankelijk.

a) Invloed van de temperatuur.

In de eerste plaats verdient vermelding de invloed, welke voor beide processen uitgaat van de *temperatuur*. De werking hiervan op de phagocytose is o.a. uitvoerig onderzocht door J. C. G. LEDINGHAM ²⁾; hij ging daarbij meestal na de

¹⁾ Zeitschr. f. Biologie, Bd. 69, Heft 8 en 9, p. 409, 1919.

²⁾ Proceedings Royal Society, B Vol. 80, 1908.

phagocytose van kokken door leucocyten van den mensch. Op eenigszins onregelmatige wijze steeg hierbij de phagocytose met de temperatuur; bij 13° C. was zij reeds aanmerkelijk, maar bij 37° C. nog veel sterker. Daarnaast vond hij evenwel, dat de invloed van de temperatuur zich slechts doet gelden op de mate van vasthechting van opsonine aan de kokken; bij elke temperatuur bestaat voor deze adsorptie een maximum, en wanneer deze dezelfde is, wanneer dus vooraf de kokken en het serum bij elkaar worden gelaten op een temperatuur van b.v. 37° C. en men voegt later de leucocyten toe voor phagocytose, dan zal steeds die phagocytose ongeveer gelijk zijn, onverschillig of bij dit laatste deel van de proef de temperatuur 37° C. bedraagt, of b.v. 18° C. of lager. Hij concludeert daaruit dat de „phagocytaire energie” van de leucocyten binnen zeer ruime grenzen onafhankelijk is van de temperatuur, vooropgesteld, dat de belading van de kokken met opsonine maximaal is.

Wanneer we ter verklaring van de phagocytose ons alleen laten leiden door de theorie der oppervlaktespanningen, zou dit onderzoek van LEDINGHAM dus een aanwijzing zijn, dat de innerlijke toestand van de leucocyten zich niet wijzigt bij verschillende temperaturen. Immers alleen dan is een dergelijke onafhankelijkheid van de temperatuur denkbaar. Nu lijkt dit op den eersten oogopslag vreemd, daar immers bekend is, dat in 't algemeen de oppervlaktespanning zeer zeker afhankelijk is van de temperatuur, en dat verder zeer zeker de stofwisselingsprocessen in de cel, welke de oppervlaktespanning kunnen wijzigen, sterk door de temperatuur worden beïnvloed. Wanneer we echter de tabellen van LEDINGHAM beschouwen, vinden we, dat hij de onafhankelijkheid der phagocytose voor temperatuurswisselingen eigenlijk alleen constateert tusschen 18° en 35° C.; bij een lagere temperatuur dan 18° C. is de

phagocytose wel degelijk duidelijk lager, ook als de kokken bij een hoogere temperatuur zijn voorbehandeld. L. vermeldt hierbij, dat bij deze lage temperatuur de voorbehandelde micro-organismen wel nog adhaereeren aan de leucocyten; hij wil daarom het phagocytoseproces in twee fasen scheiden, de adhaesie en de eigenlijke opname. Deze eigenlijke opname zou dan eenvoudig een oppervlaktespanningseffect zijn tusschen de voorbehandelde micro-organismen en de leucocyten, waarbij de amoëboïde beweging slechts een ondergeschikte rol speelt; hiertegen is in te brengen, dat de amoëboïde beweging, ook al is ze, zooals L. bedoelt, meer afhankelijk van de temperatuur dan de phagocytose, toch naar allen schijn ook een kwestie van oppervlaktespanning is. Bovendien is het de vraag, in hoeverre vanaf een temp. van 18° C. naar boven, waarom het eigenlijk gaat, de activiteit van de cel, waarop volgens L. de amoëboïde bewegelijkheid berust, nog toeneemt.

Overigens zijn de door L. meegedeelde feiten interessant genoeg. Er blijkt in elk geval uit, dat een deel van den temperatuursinvloed op de phagocytose kan worden teruggebracht tot een beïnvloeding van de adsorptie (dus van de wederzijdsche oppervlaktespanning) van serumbestanddeelen door de kokken.

Het leek me nu interessant te zien, hoe de amoëboïde bewegelijkheid van de cellen naast de phagocytose van amyllum zich wijzigt met de temperatuur, en of verder ook voor amyllum bij een dergelijke voorbehandeling met serum bij lichaamstemperatuur de phagocytose zelf bij lagere temperatuur kan plaats hebben. Hierbij kan worden opgemerkt, dat van te voren niet een analoog resultaat behoeft te worden verwacht, als L. vond; immers paardenleucocyten zijn anders dan die van den mensch; verder is het op te nemen materiaal in mijn geval grooter, en zal dus in overigens gelijke omstandigheden

moelijker worden opgenomen; temperatuursinvloeden zullen hier dus waarschijnlijk sneller aan het licht komen. Verder is, daar in mijn geval gewerkt wordt met een veel grooter aantal cellen, het resultaat nauwkeuriger.

Ik vergeleek in de eerste plaats voor paardeleucocyten, die op de gewone wijze behandeld waren, naast elkaar bij

TABEL XXXIX.

Temperatuur:	Procentgetal der leucocyten, welke amyllum opnamen:	Al of niet aan- wezigheid van pseudopodien:
5° C.	$\frac{0}{356} = 0 \%$	rond
10° C.	$\frac{1}{514} = 0 \%$	rond
15° C.	$\frac{5}{546} = 0.9 \%$	kleine uitloopers
19—20° C.	<i>a</i> $\frac{162}{510} = 31.7 \%$	tamelijk sterke uitloopers
	<i>b</i> $\frac{51}{159} = 32 \%$	
24—25° C.	<i>a</i> $\frac{355}{682} = 52 \%$	sterke uitloopers
	<i>b</i> $\frac{158}{292} = 54.1 \%$	
28—30° C.	<i>a</i> $\frac{318}{576} = 55.2 \%$	sterke uitloopers
	<i>b</i> $\frac{212}{378} = 56 \%$	
35—36° C.	<i>a</i> $\frac{267}{489} = 54.6 \%$	sterke uitloopers
	<i>b</i> $\frac{230}{429} = 53.6 \%$	

verschillende temperaturen de amoëboïde bewegelijkheid en de phagocytose van amylum; als milieu koos ik daarbij een verdunning $\frac{1}{15}$ van serum met NaCl 0.9, waarin onder gewone omstandigheden de pseudopodien en ook de phagocytose zeer duidelijk zijn. Fixatie had plaats met osmiumzuur. In tabel XXXIX werden temperaturen genomen opklimmend met ongeveer 5° C. tusschen 5° en 37° C. De tijd van inwerking was 1 uur.

We zien, dat de uitloopers voor 't eerst duidelijk worden bij een temperatuur van 15° C. en dat daar eveneens de phagocytose merkbaar wordt; van af deze temperatuur nemen èn phagocytose èn de pseudopodienvorming zeer snel toe, zoodat reeds van af een temperatuur van 20° — 25° beide hun maximum hebben bereikt.

TABEL XL.

Inwerking $\frac{1}{2}$ uur.

Temperatuur:	Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, welke kool hebben opgenomen:	Al of niet aanwezigheid van uitloopers:
37° C.	NaCl 0.9	$\frac{159}{331} = 48\%$	Leucocyten rond.
	Serum	$\frac{130}{195} = 66.6\%$	Sterke uitloopers.
16° C.	NaCl 0.9	$\frac{22}{275} = 8\%$	Leucocyten rond.
	Serum	$\frac{36}{211} = 17\%$	Kleinere uitloopers.
5° C.	NaCl 0.9	$\frac{4}{197} = 2\%$	Leucocyten rond.
	Serum	$\frac{0}{277} = 0\%$	Leucocyten rond.

Dat we evenwel uit dit samengaan in intensiteit niet mogen concludeeren, dat beide processen analoog zijn, bewijst tabel XL, waar ik in plaats van een serumverdunding met NaCl 0.9 gebruikte onverdund serum en daarnaast zuivere NaCl 0.9, en verder als object van phagocytose kool in plaats van amyllum. We zien hierbij, dat zoowel in NaCl 0.9 als in serum de phagocytose volkomen dezelfde temperatuurcurve doet zien, dat daarentegen alleen in serum de amoëboide uitloopers dezelfde curve volgen, terwijl in NaCl 0.9 bij elke temperatuur de uitloopers ontbreken.

De phagocytose blijkt dus, onafhankelijk van de amoëboide bewegelijkheid, alleen mogelijk van af een temperatuur van ongeveer 15° C. Dat we hier werkelijk met een grenstemperatuur te doen hebben, blijkt, wanneer we den inwerkingstijd veel langer nemen; ook dan neemt bij lagere temperatuur de phagocytose niet noemenswaard toe (tabel XLI).

TABEL XLI.

Milieu serum $\frac{1}{30}$. Amyllumphagocytose.

Temperatuur, waarbij de inwerking plaats heeft:	Inwerkingstijd:	Procentgetal der leucocyten, die amyllum hebben opgenomen:	Al of niet aan- wezigheid van pseudopodien:
37° C.	15 minuten	$\frac{76}{300} = 25.3\%$	sterke uitloopers.
	30 minuten	$\frac{205}{432} = 47.4\%$	
	$1\frac{1}{2}$ uur	$\frac{278}{402} = 69.1\%$	
15° C.	15 minuten	$\frac{0}{408} = 0\%$	leucocyten rond.
	30 minuten	$\frac{0}{326} = 0\%$	
	$1\frac{1}{2}$ uur	$\frac{10}{308} = 3.2\%$	

Hoe staat het nu met den invloed van de temperatuur, als we amyllum gebruiken, dat met serum is voorbehandeld?

Reeds spoedig, nadat ik amyllum voor phagocytoseproeven gebruikte, bemerkte ik, dat amyllum, behandeld met serum, uit dit serum stoffen adsorbeert, die maken, dat dit voorbehandelde amyllum ook opgenomen wordt in zuivere NaCl 0.9 (zie pag. 34). OUWELEEN¹⁾, die deze eigenschap daarna nader onderzocht, komt op grond van nauwkeurige proeven tot de gevolgtrekking, dat de opname van amyllum onder invloed van serum berust op een complexe werking: dat een stof uit het serum (complement) zich aan het amyllum hecht, en door wijziging van de oppervlaktespanning van het amyllum de aanhechting tusschen leucocyt en amyllum in NaCl 0.9 mogelijk maakt; dat daarnaast echter de serumeiwitten op de leucocyten werken en de oppervlaktespanning van deze zoodanig verlagen, dat nu opname kan plaats vinden. Tegen het aannemen van deze dubbele werking is m. i. geen bezwaar. Het wil me echter voorkomen, dat OUWELEEN zich hier den invloed van de oppervlaktespanningsverlaging verkeerd voorstelt: hij zegt n.l. dat we deze verlaging van de oppervlaktespanning der leucocyten onder den invloed van eiwitstoffen kunnen zien aan de groote uitloopers, welke deze in serum vertoonen; dit is dunkt me niet geheel juist, omdat ook bij lage oppervlaktespanning t. o. van de omgeving de leucocyten den ronden vorm zouden aannemen, als niet tegelijk wordt aangenomen, dat deze oppervlaktespanning niet overal dezelfde is. Verder legt O. hier m. i. wel wat te veel nadruk op het verschil tusschen aanhechting en opname, welk verschil hij elders principieel verwerpt, daar beide processen achtereenvolgende schakels zijn in één keten. Volgens mijne proeven blijft het bij het met serum voorbehandelde amyllum niet bij enkel adhaesie, maar vindt tevens tot een niet gering percentage opname plaats, zij het ook veel lager dan in serum. Ook de cijfers van O. wijzen in deze richting, zij het ook minder duidelijk dan de mijne. Het is ook logisch, dat tegelijk met de adhaesie in zekere mate opname plaats vindt; immers die opname vindt in NaCl 0.9 ook plaats voor kool, en door de inwerking van serum wordt amyllum in zekeren zin gelijk gemaakt aan kool.

¹⁾ l. c.

Toen ik nu op het voorbeeld van LEDINGHAM amylum bij lichaamstemperatuur liet inwerken op de onderzochte vloeistof, en vervolgens, na toevoegen der leucocyten, bij verschillende temperaturen de phagocytose onderzocht, bleek deze voorbehandeling absoluut geen invloed te hebben (tabel XLII).

TABEL XLII.

Bij 8 buisjes met serum $\frac{1}{25}$ werd gevoegd de gewone hoeveelheid amylum, en deze buisjes daarna $1\frac{1}{2}$ uur op 37° C. geplaatst; daarna paarsgewijze eenigen tijd op de verschillende temperaturen gelaten (37° , 16° , 10° , 6° C.); daarna de leucocyten toegevoegd; hierna werd de inwerking nog 30 min. voortgezet. Vervolgens fixatie in osmiumzuur.

Temperatuur, waarbij de phagocytose plaats vindt:		Procentgetal der leucocyten, die amylum hebben opgenomen:	Uitloopers der leucocyten; mate van adhaesie tusschen leucocyten en amylum:
37° C.	a	$\frac{353}{513} = 68.8\%$	Sterke uitloopers.
	b	$\frac{230}{306} = 75.1\%$	
16° C.	a	$\frac{79}{549} = 14.3\%$	Kleine, plumpe uitloopers; vrij sterke adhaesie aan amylum, soms half opgenomen.
	b	$\frac{43}{254} = 16.9\%$	
10° C.	a	$\frac{10}{476} = 2.1\%$	Leucocyten rond; nage-noeg geen adhaesie.
	b	$\frac{9}{395} = 2.2\%$	
6° C.	a	$\frac{0}{373} = 0\%$	Leucocyten rond; geen adhaesie.
	b	$\frac{0}{261} = 0\%$	

De temperatuurcurve wordt dus ook door het voorbehandelen van amylum met serum niet noemenswaard gewijzigd. Ook

komt het nu bij lagere temperatuur niet tot een adhaesie van amylum.

Op grond van deze proef wil het me daarom voorkomen, dat, in tegenstelling met wat LEDINGHAM meent, de adhaesie aan het bloedlichaampje en de daarop volgende opname opeenvolgende fasen zijn van één proces, en dat dus niet voor de opname andere krachten vereischt worden dan voor de adhaesie, zooals trouwens ook in den vroeger aangehaalden regel van RHUMBLER (p. 90) ligt opgesloten. Daarmee is evenwel niet uitgesloten, dat onder bepaalde omstandigheden, zooals vroeger reeds is aangegeven, het proces in het stadium der aanhechting blijft.

Mijns inziens vereischen de resultaten van LEDINGHAM ook niet een verklaring, zooals door hem wordt gegeven. Hij vindt voor voorbehandelde bacterien een vergaande onafhankelijkheid tusschen phagocytose en temperatuur bij temperaturen tusschen 18° en 40° C. Maar ook normaal voor niet voorbehandelde amylum vinden we diezelfde onafhankelijkheid bij temperaturen hooger dan 20° C., en begint bij deze temperatuur ook de adhaesie. Nu is het zeer wel mogelijk, dat door een voorbehandeling bij 37° de beïnvloeding van amylum (bacterien) door het serum versterkt wordt, wat op gezag van de cijfers van LEDINGHAM zeker is aan te nemen; het gevolg hiervan zal zijn, dat we hiervan den invloed zullen zien op de phagocytose bij de grenstemperatuur (even beneden 18° C.), die dus iets verlaagd wordt. Het zou zeer goed mogelijk zijn, dat ik, als ik parallelproeven had gedaan voor éénzelfde soort leucocyten met al en niet voorbehandeld amylum, ook deze geringe verschuiving zou hebben gevonden. Dat LEDINGHAM bij veel lagere temperatuur wel adhaesie van voorbehandelde bacterien en ik geen adhaesie van voorbehandeld amylum vond, is ook wel

verklaarbaar; deze adhaesie werd toch op verschillende wijze geconstateerd: L. werkte met het gefixeerde gekleurde preparaat en zegt, dat het hem wil toeschijnen, dat dan de bacterien om de witte bloedlichaampjes geordend liggen; ik daarentegen kon aan het vochtige preparaat van deze verschuiving van de adhaesiegrens niets vinden. Misschien speelt hier ook een verschillende werking van amylum en bacterie een rol.

We mogen dus wel aannemen, dat phagocytose in het algemeen binnen zeer ruime temperatuurgrenzen mogelijk is, en dat bij de minimum temperatuur het proces begint met zijn eerste phase, n.l. de adhaesie, en dat daarop de eerste phagocytose plaats heeft bij iets hogere temperatuur. Ook andere onderzoekers vonden trouwens reeds, dat de phagocytose ook bij lagere temperatuur dan 37° kan plaats hebben.

De toename in phagocytose bij hogere temperatuur vindt alleen plaats, als het milieu en de aard van het object een phagocytose überhaupt toelaten. De amoeboïde bewegelijkheid neemt eveneens toe met de temperatuur, maar alleen in een zoodanig milieu, dat deze beweging mogelijk is, dus b.v. niet in NaCl 0.9; de versterking van phagocytose en amoeboïde bewegelijkheid door de temp. zullen dus soms samengaan, als zij beide mogelijk zijn; in andere gevallen evenwel zal deze samenhang achterwege blijven.

Het afhankelijk zijn van de amoeboïde bewegelijkheid van een bepaalde temperatuur vindt een gereede verklaring daarin, dat daardoor ook de celstofwisseling wordt beïnvloed.

Het verband tusschen phagocytose en temperatuur is grootendeels onafhankelijk van de amoeboïde bewegelijkheid en waarschijnlijk terug te brengen tot een wijziging van de oppervlaktenspanningen; misschien zal ook de grootere viscositeit van den leucocyt bij lagere temperatuur, het meer naderen tot de vaste

aggregaaltstoestand, een beletsel zijn voor de phagocytose. We kunnen ons zoo heel goed den toestand denken, dat bij een bepaalde temperatuur reeds adhaesie plaats heeft, maar de te groote viscositeit de opname belet.

Een geheel andere temperatuurcurve vonden TH. MADSEN en OVE WULFF ¹⁾ voor de phagocytose door menschenleucocyten in het milieu NaCl 0.9 zonder serum; de phagocytose van *b.coli* en staphylokokken nam hier van af 5° C. toe volgens een continue lijn, die bij 37° zijn maximum bereikte en dan snel afnam. Telling had plaats volgens de methode van WRIGHT. Het optimum zou hooger liggen voor personen met koorts, dus altijd overeenstemmen met de oogenblikkelijke temperatuur van het lichaam. Deze onderzoekers vinden tusschen 25° C. en 37° C. juist een zeer sterke stijging. Het verschil met mijne resultaten, zooals die in tabel XXXIX zichtbaar zijn, is zóó opvallend, dat het mij voorloopig waarschijnlijk voorkomt, dat hier een verschil tusschen de leucocyten van mensch en paard aanwezig is; het verschil kan niet veroorzaakt worden door de verschillende telmethode.

b) Verband tusschen phagocytose en amoeboide bewegelijkheid in verschillend milieu.

Reeds van verschillende zijden is er op gewezen, dat men vaak amoeboide bewegelijkheid en phagocytose niet ziet samengaan, dat bij de phagocytose het uitzenden van pseudopodien vaak uitblijft. RHUMBLER ²⁾ uit zich in dezen zin; ook LEDINGHAM ³⁾ houdt de beide processen van elkaar gescheiden; zoo wijst b.v. ook SAWTCHENKO ⁴⁾ er op, dat phagocytose van kool zonder

¹⁾ Annales de l'Institut Pasteur, 33, 7, p. 437, 1919.

²⁾ l. c.

³⁾ l. c.

⁴⁾ Arch. d. Sc. Biol. de St. Petersbourg, T. XV, No. 2.

uitloopers kan plaats hebben in NaCl 0.9, dat evenwel door toevoeging van serum de uitloopers zich vormen; hij brengt dit trouwens in verband met de sterkere phagocytose in serum.

Dat mijne eigen resultaten een groote onafhankelijkheid tusschen phagocytose en amoëboïde bewegelijkheid doen zien, treedt duidelijk aan het licht, wanneer we de proeven, in hoofdstuk I vermeld, nog eens de revue laten passeeren, maar nu de phagocytose tegelijk met de amoëboïde bewegelijkheid beschouwen.

Om te beginnen met die stoffen, welke de amoëboïde bewegelijkheid het sterkst beïnvloeden, n.l. de stoffen in het serum aanwezig, zien we, voor zoover de phagocytose van amyllum aangaat, tusschen beide processen nog een verband, ongeveer als bij den temperatuursinvloed werd gevonden; phagocytose en amoëboïde bewegelijkheid nemen toe met de hoeveelheid serumstoffen; als de phagocytose maximaal is, b.v. in serum $\frac{1}{6}$, zijn ook de uitloopers maximaal. Maar wederom is dit in 't minst geen bewijs, dat beide processen nauw samenhangen; immers we behoeven slechts het serum te inactiveren, of in plaats van amyllum kool te nemen, en we krijgen een geheel gewijzigd phagocytosebeeld, terwijl de amoëboïde bewegelijkheid absoluut niet verandert.

Wij hebben gezien, dat de sterke amyllumphagocytose onder den invloed van serumstoffen voor een deel van ionenwerking afhangt, maar voor het grootste deel een gevolg is van de aanwezigheid van colloïden.

Geldt voor de sterke amoëboïde bewegelijkheid in serum en serumverduunningen hetzelfde? Zijn ook voor het tot standkomen van de amoëboïde beweging colloïde serumstoffen noodig?

Juist in de laatste jaren hebben zich verschillende onderzoekers met het vraagstuk der amoëboïde protoplasmabeweging bezig gehouden. In de eerste plaats noem ik hier H. FRIEDEMANN

en A. SCHÖNFELD ¹⁾); zij merkten op, dat bloedleucocyten op object- en dekglazen van kwarts alleen dan zich amoeboid bewegen, als ze zich bevinden in een sterk visceus milieu, d.w.z. in niet verdund serum b.v. of een sterke oplossing van gummi arabicum enz. Naar aanleiding van deze ontdekking behandelen de schrijvers de vraag, waardoor ten slotte de amoeboide beweging tot stand komt. Zij nemen ook op het voetspoor van BÜTSCHLI, QUINCKE, MACALLUM, RHUMBLER enz. een plaatselijk verminderde oppervlaktetension als oorzaak aan, en onderstellen dan verder, dat de leucocyten behooren tot die soort amoeboide cellen, welke zich alleen kunnen bewegen met behulp van een onderlaag; zij gaan hierbij o.a. af op het feit, dat bewegingen in de vrije vloeistof voor leucocyten nog nooit zijn geconstateerd, en geven aan, dat volgens JENSEN ²⁾) sommige amoebensoorten dit wel doen; dit leek me eenigszins vreemd, omdat m.i. voor *amoeboide locomotie*, zooals reeds vroeger is uiteengezet, vastzitten aan een onderlaag een noodzakelijke voorwaarde is; toen ik het aangehaalde stuk van JENSEN er op nasloeg, bleek me dan ook, dat hij zich woordelijk als volgt uit: „*bei der Bewegung eines Plasmakörpers an der Grenze zweier Medien kann diese Bewegung einen besonderen Erfolg erzielen, nämlich eine aktive Ortsveränderung des ganzen Plasmakörpers, welche niemals im Schoosse eines einzigen Mediums zu stande kommt.*” Locomotie is dus een vorm van amoeboide bewegelijkheid bij aanwezigheid van een derde oppervlak. RHUMBLER deelt zelfs mede, dat amoeben voor dit doel op de onderlaag een kleverige stof afscheiden.

Op deze verkeerde opvatting voortbouwend, nemen FR. en SCH. nu aan, dat bij het begin van de proef het witte

¹⁾ Bioch. Zeitschrift, **80**, p. 312.

²⁾ Erg. Physiol. **1^u**, p. 7.

bloedlichaampje, als liggende rondom in een vloeistof, altijd rond is, een meening, die ik ook door LEDINGHAM¹⁾ vond weergegeven. In de verdere ontwikkeling van hun denkbeeld over de wijze, waarop de leucocyt kan reageeren, wanneer hij in een dunne vloeistoflaag in aanraking komt met de kwartsplaat, zijn de schrijvers m.i. ook min of meer onduidelijk. Ze beschouwen hierbij de vormverandering, welke de leucocyt steeds min of meer onder het dekglas ondergaat, van hetzelfde gezichtspunt uit als het uitzenden van pseudopodien, dat de beweging veroorzaakt. Zooals evenwel reeds op pag. 89 e.v. is uiteengezet, is de uitbreiding onder het objectglas te vergelijken met de phagocytose, terwijl de amoëboïde beweging, die veroorzaakt wordt door dezelfde krachten, als welke de pseudopodienvorming bewerken, alleen onder bepaalde omstandigheden tot stand komt, n.l. als de attractie glas-leucocyt niet te groot is. Hierbij zal zeer zeker, zooals ook FR. en SCH. zeggen, de inwendige weerstand van den leucocyt van belang zijn, alsook de viscositeit van het medium, en het is dan ook zeer goed te verklaren, dat zij de amoëboïde plaatsverandering alleen konden constateeren in vloeistoffen van hooge viscositeit. Tengevolge van hunne foutieve interpretatie van dit verschijnsel komen ze er nu evenwel toe, in deze viscositeit de oorzaak te zoeken van pseudopodienvorming in het algemeen, en vergeten daarbij, dat de hoofdoorzaak moet liggen in processen, welke zich in het protoplasma afspelen. Waren deze er niet, dan zou het ook in een sterk visceuze vloeistof op een onderlaag niet tot locomotie komen; de leucocyt zou zich enkel min of meer uitbreiden, afhankelijk van de verschillende adhaesie- en cohaesiekrachten en daarmee uit.

¹⁾ Journal of Hygiene. Vol. XII, No. 3, p. 320.

Over de m.i. onjuiste conclusies, waartoe verder FR. en SCH. komen, door hunne viscositeitstheorie ook door te voeren op verschijnselen als chemotaxis en emigratie, kom ik aan het eind van dit hoofdstuk nog terug.

Al is nu echter het verschijnsel, dat FR. en SCH. opmerken, geen bewijs, dat alleen in een sterk visceus milieu het komt tot de vorming van protoplasmauitloopers, tengevolge van de ondoelmatige proefneming, zoo bestaat dan toch de mogelijkheid, dat het zoo is, en de waarschijnlijkheid hiervan wordt grooter, als we onze eigen resultaten er mee vergelijken. Immers ook bij fixatie in de vrije vloeistof vond ik b.v. in zuivere NaCl 0.9 geen pseudopodien, terwijl ze bij toevoeging van een betrekkelijk geringe hoeveelheid serum constant optraden. Om evenwel tot een oorzakelijk verband tusschen viscositeit en het uitzenden van pseudopodien te kunnen concludeeren, moet aangetoond worden, dat in geen ander milieu die pseudopodienvorming voorkomt. We moeten dan de laatste niet, zooals FR. en SCH., bestudeeren op een onderlaag; immers het feit, dat daar een pseudopodienvorming in een bepaald milieu niet wordt gezien, is alleen een bewijs, dat ze er niet in tot uiting kan komen, en niet, dat ze er onder normale verhoudingen niet mogelijk zouden zijn.

We moeten dus met de fixatiemethode nagaan, of het mogelijk is, een eiwit- (of colloid-) vrij milieu te vinden, waarin het kan komen tot het uitzenden van pseudopodien. Deze vraag is van fundamenteel belang, omdat volgens de vroeger ontwikkelde theorie de pseudopodienvorming staat onder invloed van protoplasmaveranderingen, en we dus meteen de vraag beantwoorden, of deze processen al dan niet colloiden in het omgevende milieu noodig hebben om tot uiting te komen. We kunnen dus reeds zeggen, dat deze processen door

serumbestanddeelen gunstig worden beïnvloed. Natuurlijk zijn hier ook uitwendige factoren in het spel; OUWELEEN¹⁾ wijst met recht op 'de verminderde oppervlaktespanning van den leucocyt in zijn geheel in een colloïdrijk milieu; dit zal natuurlijk maken, dat de kracht, waarmee de leucocyt den bolvorm nastreeft, kleiner wordt. Men kan zich denken, dat daarbij locale opp.spanningswisselingen een grooter vormverandering zullen bewerken; maar toch zullen dan nog stofwisselingsprocessen den stoot moeten geven. Op de beteekenis dezer stofwisselingsprocessen wijst ook L. HABERLANDT²⁾ in een drietal publicaties over het cultiveeren van kikkerleucocyten in vitro.

Gezien den invloed, dien, naar ik vond, de serumcolloïden hadden op het phagocytoseproces, was ik eerst van meening, dat ook de werking op de amoëboïde beweging hierop zou berusten. In mijn vroegere onderzoekingen trof ik in eiwitvrije vloeistoffen hoogstens onbeteekenende plompe uitloopers aan; bijna steeds waren de leucocyten volmaakt bolvormig. Er was slechts ééne uitzondering: ook onder den invloed van de zouten der lagere vetzuren zooals Na-propionaat, kon ik bijna steeds zeer sterke pseudopodienvorming constateeren in serumvrij milieu.

Nu was echter geen der vroeger onderzochte vloeistoffen een physiologisch colloïdvrij milieu; in het vorige hoofdstuk is dit reeds besproken, en werd naar aanleiding daarvan de phagocytose ook in meer physiologische milieu's onderzocht. Het was logisch, ook de pseudopodienvorming te onderzoeken in een zooveel mogelijk physiologische vloeistof, b.v. ultra-filtraat. Hoe gedraagt zich de pseudopodienvorming, naast de phagocytose, in dergelijke vloeistoffen?

¹⁾ l. c.

²⁾ Zeitschr. f. Biologie, Bd. 69, p. 275, p. 331 en p. 409.

Ik kon nu steeds constateeren, dat in al of niet neutrale NaCl 0.9-oplossing de uitloopers of geheel ontbraken, of zeer klein waren; dat ze door toevoeging van CaCl_2 aan deze oplossing niet noemenswaard versterkten; dat in het (niet voorbehandeld) ultrafiltraat, dat, zooals reeds vroeger is opgemerkt, alkalisch reageert, eveneens alle uitloopers ontbraken. Wanneer ik evenwel door ultrafiltraat zooveel CO_2 doorleidde, dat de reactie neutraal of zeer zwak zuur was, waren de uitloopers ongeveer dezelfde als in het serum of de serumverduunningen.

Hieruit volgt dus, dat het ultrafiltraat met een koolzuurspanning, zooals die in het bloed voorkomt, in staat is zeer sterke amoebide vormveranderingen in de leucocyten te voorschijn te roepen.

Nadat ik dit reeds had geconstateerd bij de exsudaatleucocyten van het konijn, werd het verschijnsel nog veel frappanter, toen ik de bloedleucocyten van het paard op dezelfde wijze onderzocht.

We zien hier dus een invloed op de amoebide bewegelijkheid, die van serumcolloïden geheel onafhankelijk is.

Ik heb natuurlijk getracht na te gaan, wat hier het werkzame bestanddeel van het ultrafiltraat was, door ook verschillende kunstmatig bereide physiologische oplossingen te onderzoeken. Ik vermeldde reeds, dat toevoeging van Ca-zouten aan NaCl 0.9 geheel onwerkzaam is in deze richting. Verder heb ik in een aantal proeven een geheele reeks combinaties onderzocht:

- | | |
|---|--------------------|
| 1) NaCl 0.9 (in niet uitgekookt gedestilleerd water). | |
| 2) NaCl 0.9 (in uitgekookt gedestilleerd water (minder zuur). | |
| 3) NaCl 0.9, als N ^o . 1, maar geneutraliseerd. | |
| 4) NaCl 0.9, als N ^o . 2, „ „ | |
| 5) NaCl 0.9 + CaCl_2 6aq. 0.02 | } geneutraliseerd. |
| 6) NaCl 0.9 + CaCl_2 6aq. 0.04 | |
| 7) NaCl 0.9 + CaCl_2 6aq. 0.08 | |
| 8) NaCl 0.7 + CaCl_2 6aq. 0.02 | |

- 9) $\text{NaCl } 0.7 + \text{CaCl}_2 \text{ 6aq. } 0.02 + \text{NaHCO}_3 \text{ 0.18}$ (geneutraliseerd door CO_2 -doorleiding).
- 10) $\text{NaCl } 0.7 + \text{NaHCO}_3 \text{ 0.18}$.
- 11) $\text{NaCl } 0.7 + \text{CaCl}_2 \text{ 6aq. } 0.02 + \text{NaHCO}_3 \text{ 0.18} + \text{KCl } 0.02$.
- 12) $\text{NaCl } 0.7 + \text{CaCl}_2 \text{ 6aq. } 0.04 + \text{NaHCO}_3 \text{ 0.18} + \text{KCl } 0.02$.
- 13) $\text{NaCl } 0.8 + \text{CaCl}_2 \text{ 6aq. } 0.02 + \text{NaHCO}_3 \text{ 0.02} + \text{KCl } 0.02$.

No. 11 en 12 komen dus in samenstelling overeen met de wijziging, door BRINKMAN in de vloeistof van RINGER aangebracht, terwijl No. 13 met deze vloeistof van RINGER overeenstemde. No. 11 en 12 waren ook nauwkeurig geneutraliseerd door CO_2 -doorleiding.

Ik kreeg dus een aantal combinaties, waarin achtereenvolgens CaCl_2 , NaHCO_3 , KCl toegevoegd of wegelaten waren.

In al de proeven was het resultaat steeds constant hetzelfde: *alleen in die vloeistoffen, welke NaHCO_3 bevatten, zijn uitloopers voorhanden bij neutrale of zwak zure reactie*; K en Ca hebben nagenoeg geen invloed; immers ook in een mengsel van NaCl en NaHCO_3 (N^o. 10) komen de uitloopers. De sterkte der uitloopers neemt toe met het HCO_3 gehalte; in N^o. 13 is zij b.v. minder groot dan in N^o. 10, 11 en 12. Wel was het duidelijk, dat in ultrafiltraat de uitloopers het grootst waren.

Ik laat hieronder nog 3 tabellen volgen, waaruit deze resultaten duidelijk blijken (tabel XLIII, XLIV en XLV).

Zooals uit tabel XLIII blijkt, treedt het verschil bij de leucocyten van het konijn minder op den voorgrond, ten eerste omdat daar ook in $\text{NaCl } 0.9$ reeds eenige uitloopers zijn, en verder, omdat b.v. in ultrafiltraat de uitloopers minder sterk zijn uitgesproken dan bij het paard.

Terwijl in tabel XLIV de phagocytose in al de onderzochte vloeistoffen slechts zeer weinig wisselt, is het verschil in pseudopodienvorming zeer duidelijk; dat in ultrafiltraat werkelijk

TABEL XLIII.

(Dezelfde proef als tabel XXVIII).

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Paard		Konijn	
	Procentgetal leucocyten, welke hebben opgenomen:	Al of niet pseudopodien:	Procentgetal leucocyten, die hebben opgenomen:	Al of niet pseudo-podien:
NaCl 0.9	$\frac{13}{385} = 3.3\%$	Leucocyten rond	$\frac{7}{257} = 2.7\%$	Nagenoeg rond
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{16}{235} = 6.8\%$	rond	$\frac{3}{209} = 1.4\%$	enkele klein uitloopers
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.025 (neutraal)	$\frac{92}{382} = 24\%$	rond	$\frac{39}{250} = 15.6\%$	iets meer uitloopers
Gewijzigde Ringer	$\frac{9}{288} = 3.1\%$	sterke pseudopodien-vorming	$\frac{11}{169} = 6.4\%$	sterkere uitloopers
Gewijzigde Ringer zonder KCl	$\frac{12}{247} = 4.8\%$	" "	$\frac{9}{169} = 5.2\%$	sterkere uitloopers
Gewijzigde Ringer met CaCl ₂ 6aq. 0.06	$\frac{36}{269} = 13.3\%$	" "	$\frac{19}{217} = 8.7\%$	sterkere uitloopers
Ultrafiltraat paard (neutraal)	$\frac{33}{379} = 8.7\%$	zeer sterke pseudopodienvorming	$\frac{101}{210} = 48\%$	sterkere uitloopers

deze laatste het sterkst was, bleek o.a. hieruit, dat alleen in het ultrafiltraat ook een tamelijk groot aantal van de eosinophile korrelcellen niet meer rond was, maar lang cilindrisch uitgerek.

We zien bij de leucocyten van het paard overal, dat de phagocytose de schommelingen in de amoeboïde bewegelijkheid absoluut niet volgt. Zoo vinden we vaak een tamelijk sterke phagocytose in een zuiver NaCl-CaCl₂-mengsel (tabel XLV en tabel XLIII), sterker dan in de gewijzigde RINGER en zelfs dan in ultrafiltraat, zonder een spoor van pseudopodien. In

TABEL XLIV.

Versche paardenleucocyten. Inwerking op 37° C. 1/2 uur. Fixatie
osmiumzuur.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal leucocyten, die amylum hebben opgenomen:	Al of niet pseudopodien:
NaCl 0.9	$\frac{0}{208} = 0 \text{ ‰}$	Leuc. rond
NaCl 0.9 (uitgekookt aq. dest.)	$\frac{1}{154} = 0.6 \text{ ‰}$	" "
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{2}{198} = 1 \text{ ‰}$	" "
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 6aq. 0.04 (neutraal)	$\frac{14}{203} = 6.8 \text{ ‰}$	Enkele kleine uitloopers hier en daar
NaCl 0.9 + CaCl ₂ 6aq. 0.04 uitgekookt aq. dest. (neutraal)	$\frac{11}{319} = 3.4 \text{ ‰}$	Enkele kleine uitloopers hier en daar
NaCl 0.85 + CaCl ₂ 6aq. 0.02 (neutraal)	$\frac{12}{325} = 3.7 \text{ ‰}$	Enkele kleine uitloopers hier en daar
NaCl 0.85 + CaCl ₂ 6aq. 0.04 (neutraal)	$\frac{15}{256} = 5.8 \text{ ‰}$	Enkele kleine uitloopers hier en daar
NaCl 0.85 + CaCl ₂ 6aq. 0.06 (neutraal)	$\frac{12}{258} = 4.6 \text{ ‰}$	Enkele kleine uitloopers hier en daar
NaCl 0.85 + CaCl ₂ 6aq. 0.04 + KCl 0.02 (neutraal)	$\frac{16}{368} = 4.3 \text{ ‰}$	Enkele kleine uitloopers hier en daar
Gewijzigde Ringer (CaCl ₂ 6aq. 0.04)	$\frac{9}{292} = 3 \text{ ‰}$	Sterke uitloopervorming
Gewijzigde Ringer (CaCl ₂ 6aq. 0.02)	$\frac{12}{412} = 3 \text{ ‰}$	Sterke uitloopervorming
Gewijzigde Ringer zonder KCl	$\frac{7}{300} = 2.3 \text{ ‰}$	Sterke uitloopervorming
Ultrafiltraat (neutraal)	$\frac{19}{250} = 7.8 \text{ ‰}$	Zeer sterke uitlooper- vorming

TABEL XLV.

Versche paardenleucocyten; $\frac{1}{2}$ uur op 37° C.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Procentgetal der leucocyten, die amylum hebben opgenomen:	Al of niet pseudopodien:
NaCl 0.9 (neutraal)	$\frac{1}{250} = 0.25\%$	rond
NaCl 0.9 + CaCl_2 0.02 (neutraal)	$\frac{22}{216} = 10.1\%$	rond
NaCl 0.7 + CaCl_2 0.02 (neutraal)	$\frac{94}{306} = 30.7\%$	rond
NaCl 0.7 + NaHCO_3 0.18 (neutraal)	$\frac{2}{188} = 1\%$	sterke uitloopers
Gewijzigde Ringer (neutraal) zonder KCl	$\frac{7}{202} = 3.4\%$	sterke uitloopers
Gewijzigde Ringer	$\frac{8}{203} = 3.9\%$	sterke uitloopers
Ringer (oud voorschrift)	$\frac{14}{228} = 6.1\%$	vrij sterke uitloopers

tabel XLV is de invloed van CaCl_2 op de phagocytose buitengewoon sterk bij toevoeging aan de hypisotonische NaCl-oplossing van 0.7% .

Ook op varkensleucocyten bleek ultrafiltraat de pseudopodienvorming sterk te bevorderen, o.a. in de proef, waarop tabel XXXI betrekking heeft.

Wat de exsudaatleucocyten betreft, hier zijn over 't algemeen de pseudopodien ook in serum minder sterk, en in NaCl 0.9 vaak niet geheel ontbrekend, vooral als de leucocyten niet lang in de buikholte hebben vertoefd; in dit geval vinden we door

toevoeging alleen van CaCl_2 of zelfs door neutraliseeren van de NaCl opl. de pseudopodienvorming versterkt, maar meer uitgesproken door de gewijzigde oplossing van RINGER met veel NaHCO_3 en door neutraal ultrafiltraat.

Ook voor de amoeboide bewegelijkheid bleek het ultrafiltraat van het eigen dier geen specifieke werking uit te oefenen.

Evenals HAMBURGER en BRINKMAN ¹⁾ voor de permeabiliteit van de nierglomeruli aantoonde, bleek dus ook voor de amoeboide beweging het zooveel mogelijk in stand houden van physiologisch aanwezige factoren, waarnaar in de wijziging van RINGER'S oplossing gestreefd is, van fundamenteele beteekenis.

Serumcolloiden, welke de phagocytose zeer sterk bevorderen, zijn dus voor de amoeboide bewegelijkheid niet absoluut noodzakelijk; deze laatste komt ook tot uiting in een physiologisch, colloidvrij milieu, waarbij de aanwezigheid van HCO_3 in voldoende hoeveelheid de voornaamste werkzame factor schijnt te zijn.

Hiermee is niet gezegd, dat de serumcolloiden in 't geheel geen invloed uitoefenen op de amoeboide beweging. Maar we zullen den duidelijken invloed van serumtoevoeging tot zelfs in concentraties van $\frac{1}{25}$ toch zeker voor een deel mogen toeschrijven aan de bijvoeging van NaHCO_3 , dat in dergelijke serumverduunningen toch nog een concentratie zal bereiken als b.v. in de oplossing volgens het oude voorschrift van RINGER.

Opmerkelijk evenwel is, dat we tusschen serumvrije en serumhoudende oplossingen weer hetzelfde verschil vinden, wat betreft den invloed van H-ionen op de pseudopodienvorming, dat we ook bij de phagocytose opmerkten. Wanneer we in

¹⁾ l. c.

serumverduunningen van een concentratie van b.v. $\frac{1}{8}$, welke neutraalrood geel kleuren, CO_2 doorleiden, verdwijnen de pseudopodien, welke bij alkalische reactie aanwezig waren, direct. In ultrafiltraat zijn bij deze alkalische reactie geen pseudopodien, en maakt de doorvoering van CO_2 tot neutrale of zwak zure reactie, dat juist de pseudopodien zich vormen.

Nu wordt in 't algemeen aangegeven, dat verhooging van het aantal H-ionen de pseudopodienvorming tegengaat. Zoo vond b.v. ook SCHWYZER ¹⁾ in eiwithoudend milieu steeds bij geringe H-ionenconcentratie de sterkste amoeboide beweging.

De door mij onderzochte serumverduunningen waren evenwel verduunningen met NaCl 0.9, waar we kunnen aannemen, dat de normale blokwerking, die het serum op de H-ionenconcentratie uitoefent, onvoldoende wordt, en waar een betrekkelijk geringe CO_2 -doorvoering de aciditeit zeer snel verhoogt. Wanneer we de blokwerking verbeteren, door, in plaats van met NaCl 0.9, te verdunnen met ultrafiltraat, dan zien we de remmende werking van CO_2 -doorvoering weer verdwijnen: (tabel XLVI). *Verder zien we, dat ook andere colloïden behalve die van het serum de amoeboide bewegelijkheid kunnen bevorderen; immers in deze proef zien we ook een sterke uitloopervorming, naast eenige phagocytose, in een 7% oplossing van gummi arabicum, maar alleen, nadat deze (van nature zure) oplossing was geneutraliseerd: de niet geneutraliseerde oplossing geeft geen phagocytose en absoluut geen pseudopodienvorming.* Ten slotte zien we uit de tabel, dat reeds bij een geringe CO_2 -toevoer de amoeboide bewegelijkheid in ultrafiltraat tot stand komt, en dat zij nog bestaat, als onder den invloed van de CO_2 de kleur met neutraalrood nagenoeg rood

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1914. Bd. 60, p. 447.

TABEL XLVI.

Versche paardenleucocyten. 30 min. op 37° C.

Vloeistoffen, die hebben ingewerkt:	Kleur met neutraal-rood:	Procent leucocyten, die amyllum hebben opgenomen:	Pseudopodien-vorming:
NaCl 0.9	rood	$\frac{22}{190} = 11.6\%$	nagenoeg rond
Serum-NaCl 0.9 $\frac{1}{5}$	geel	$\frac{130}{153} = 84.9\%$	duidelijke pseudopodien
Serum-NaCl 0.9 $\frac{1}{5}$ CO ₂	rose, iets oranje tint	$\frac{142}{168} = 84.5\%$	duidelijke pseudopodien
Serum-NaCl 0.9 $\frac{1}{20}$	rose oranje	$\frac{212}{264} = 80.3\%$	duidelijke pseudopodien
Serum-NaCl 0.9 $\frac{1}{20}$ CO ₂	rood	$\frac{2}{282} = 0.7\%$	leucocyten rond
Serum-ultrafiltraat $\frac{1}{5}$	geel	$\frac{145}{174} = 83.3\%$	duidelijke pseudopodien
Serum-ultrafiltraat $\frac{1}{5}$ CO ₂	rose oranje	$\frac{121}{145} = 83.4\%$	duidelijke pseudopodien
Serum-ultrafiltraat $\frac{1}{20}$	geel	$\frac{168}{205} = 81.9\%$	duidelijke pseudopodien
Serum-ultrafiltraat $\frac{1}{20}$ CO ₂	rose oranje	$\frac{143}{178} = 80.3\%$	duidelijke pseudopodien
Ultrafiltraat + CO ₂ (verzadigd)	rose	$\frac{45}{231} = 19.4\%$	tamelijk sterke pseudopodien
Ultrafiltraat + CO ₂ $\frac{6}{8}$	rose, iets oranje tint	$\frac{28}{186} = 15\%$	sterke pseudopodien
Ultrafiltraat + CO ₂ $\frac{5}{8}$	rose oranje	$\frac{46}{230} = 20\%$	sterke pseudopodien
Ultrafiltraat + CO ₂ $\frac{1}{2}$	rose oranje	$\frac{36}{251} = 14.3\%$	sterke pseudopodien
Ultrafiltraat + CO ₂ $\frac{1}{4}$	oranje met iets rose tint	$\frac{31}{215} = 14.4\%$	sterke pseudopodien
Ultrafiltraat + CO ₂ $\frac{1}{8}$	oranje met iets rose tint	$\frac{28}{176} = 16\%$	vrij sterke pseudopodien
Ultrafiltraat	geel	$\frac{4}{146} = 2.7\%$	slechts kleine uitloopers
NaCl 0.9 + gummi arabicum 7%	rood	$\frac{0}{318} = 0\%$	rond
NaCl 0.9 + gummi arabicum 7% (neutraal)	rose oranje	$\frac{44}{176} = 20\%$	sterke pseudopodien

is geworden. De tabel is voor een deel reeds in tabel XXXVI aangehaald (zie pag. 75).

Waar dus de pseudopodienvorming, evenals de phagocytose sterk van den concentratiegraad der H-ionen afhankelijk is, zien we daarnaast, evenals bij de phagocytose, dat door de aanwezigheid van serumcolloïden het proces naar den alkalischen kant is verschoven; immers in ultrafiltraat, verzadigd met CO_2 tot lichtzure reactie, zijn nog pseudopodien; in serum $1/20$, waardoor CO_2 is geleid, zijn deze niet meer.

Dat ook andere dan serumcolloïden amoeboïde uitloopers kunnen veroorzaken, is in overeenstemming met hetgeen FRIEDEMANN en SCHÖNFELD aangeven; maar terwijl deze schrijvers amoeboïde bewegingen constateerden in een 4–8 % oplossing van gummi arabicum in NaCl 0.9, waarin zij een druppel konijnbloed lieten vallen, bewijzen mijne proeven, dat (ten minste wat de paardeleucocyten betreft) de gummi arabicum deze werking alleen ontplooit bij gunstige concentratie der H-ionen. In hoeverre FRIEDEMANN en SCHÖNFELD, die alleen bloed met gummi arabicum-oplossing verdunden, een gunstige concentratie van H-ionen toevallig bewerkstelligden, vermag ik niet te beoordeelen.

In elk geval kunnen colloïden ook zonder NaHCO_3 de amoeboïde beweging opwekken, en is het derhalve niet noodig, de werking van toevoeging van serum op de amoeboïde bewegelijkheid alleen toe te schrijven aan het carbonaatgehalte.

Dat het verschil in pseudopodienvorming tusschen vloeistoffen als NaCl 0.9 aan den eenen kant, en serumverduningen en ultrafiltraat aan de andere zijde zeer frappant is, kunnen de aan het eind van dit werk gereproduceerde microphotographieën aantonen; zij illustreeren tevens het fraaie phagocytosebeeld met amylum.

4) AMOEBOIDE BEWEGELIJKHEID EN PHAGOCYTOSE BIJ DE VERSCHILLENDE SOORTEN WITTE BLOEDLICHAAMPJES.

Daar ik bij mijne proeven met paardeleucocyten in aanraking kwam met de verschillende soorten witte bloedlichaampjes, zooals ze in het bloed voorkomen, werd mijn aandacht noodzakelijkerwijze gevestigd op de manier, waarop die verschillende soorten zich gedragen ten opzichte van de amoeboide beweging en de phagocytose. In het paardenbloed is de verhouding tusschen lymphocyten en gegranuleerde cellen ongeveer als bij den mensch; volgens mijne ervaring is evenwel het percentage der eosinophiele cellen zeer wisselend; vaak bedraagt het slechts een paar procent, maar niet zelden is het aantal vermeerderd tot wel 20 $\%$; deze cellen vallen direct op door hunne zeer groote korrels van zeker 2—3 μ doorsnede, van de kleur der roode bloedlichaampjes; ze worden sterk rood gekleurd door eosine en sterk blauw door methyleenblauw. Dat ze onmiddellijk opvallen, doen de bijgevoegde microphoto's duidelijk zien.

De lijn van mijn onderzoek maakte voor mij slechts zelden het maken van een gekleurd preparaat noodig; mijn indruk omtrent het gedrag der verschillende celsoorten t.o.v. amoeboide bewegelijkheid en phagocytose berust dan ook alleen op wat ik in het ongekleurde preparaat kon waarnemen. Nu laten zich op die wijze alleen de eosinophiele cellen en de z.n. kleine lymphocyten duidelijk afgrenzen; daar meestal de contouren van de kern niet duidelijk zijn, is het onderscheid tusschen groote lymphocyten, neutrophielen en de z.n. groote mononucleairen niet duidelijk genoeg, om daarop een meening te baseeren.

Wat de eosinophiele cellen betreft, is de *phagocytose* bij deze celsoort slechts onbeduidend; als een enkele al een korreltje

heeft opgenomen, nooit is de geheele cel met partikels gevuld. Waarschijnlijk is hier de vulling van de cel met eosinophiele korrels een mechanisch beletsel; de amoeboïde bewegelijkheid is duidelijk aanwezig, maar van een ander karakter dan bij de neutrophiele cellen; in den vorm van locomotie gezien, is zij sneller; de uitloopers zijn plomper; meestal beperkt zij zich tot het uittrekken van de cel tot een cylindervorm, die zich voortschuift. (Zie Microphoto No. X.)

Waar de neutrophiele cel in hoofdzaak het onderwerp van beschouwing in de voorgaande hoofdstukken was, behoeft deze geen afzonderlijke bespreking; phagocytose en amoeboïde bewegelijkheid zijn hier het sterkst en het fijnst ontwikkeld.

Als ik ten slotte mijn indruk meedeel over het gedrag der lymphocyten in dezen, bedoel ik daarmee niet partij te kiezen in den strijd, of deze cellen tot phagocytose en amoeboïde beweging in staat zijn, ja of neen. Immers daartoe zijn mijn ongekleurde preparaten ten eenenmale onvoldoende. Ook zijn er in den loop der jaren zooveel ontwijfelbare mededeelingen gekomen over amoeboïde bewegelijkheid van lymphocyten, dat het onbegrijpelijk is, dat NAEGELI in zijn werk over bloedziekten op het voetspoor van de school van EHRLICH dit nog steeds niet wil erkennen. Uit het feit echter, dat een geheele rij onderzoekers aan de lymphocyten elke pseudopodienvorming ontzegt, volgt in elk geval, dat deze eigenschap hier niet zoo in het oog springt als bij de neutrophiele cellen. Mijn ervaring is, dat in verschillende milieu's de kleine lymphocyten nagenoeg nooit phagocyteeren, en dat ik er in gunstige milieu's slechts onbeduidende pseudopodien kon fixeeren; meestal waren de cellen bolvormig. De groote en kleinere mononucleaire cellen uit het peritoneaalexudaat van het konijn hebben daarentegen sterke phagocytose en duidelijke pseudopodienvorming. Het is mijn

overtuiging, dat het meerdere of mindere overwegen van het protoplasmavolume boven dat van de kern het gedrag van de cel in dit opzicht richt, niet zoozeer omdat de kern een impediment is, want ook de kern is vloeibaar, maar omdat de absolute hoeveelheid protoplasma onvoldoende is bij de kleine lymphocyten.

5. AMOEBOIDE BEWEGELIJKHEID EN EMIGRATIE.

Aan de bespreking van de pseudopodienvorming sluit zich het verschijnsel van de emigratie direct aan, d.w.z. van de amoeboide beweging, die in één richting is geleid. Door mijn onderzoek van exsudaatleucocyten kwam ik ook hiermee in aanraking; ik zag het verschijnsel optreden onder uiteenlopende omstandigheden, en daarom lijkt het me niet ongewenscht, mijne ervaringen te toetsen aan de meeningen en theorieën, die over de emigratie van cellen uit de bloedbaan bestaan.

De oorzaak, waardoor onder bepaalde omstandigheden een deel der witte bloedlichaampjes de bloedbaan verlaat, ligt eigenlijk nog geheel in het duister; de wijze, waarop het geschiedt, is tamelijk goed bekend geworden van het oogenblik af, dat COHNHEIM het optreden er van bij ontsteking nauwkeurig naging. Men begreep reeds spoedig, dat de oorzaak niet alleen in de verhoogde locale bloeddruk kon zetelen; immers niet bij elke bloeddrukverhoging komt het tot exsudatie; en bovendien zou die drukverhoging toch alleen effect hebben op een bepaald soort cellen, en moeten dus bepaalde eigenschappen dezer cellen mede van invloed zijn. Men is het er over eens, dat aan de acute exsudaatvorming in hoofdzaak alleen de neutrophiele cellen te pas komen; het moet dus een specifieke invloed zijn, werkende op dit soort cellen.

Toen de bacteriologie ging opbloeien, en men de gecompliceerde middelen leerde kennen, waarmee de bacterien en het

lichaam, dat ze zijn binnengedrongen, elkaar wederkeerig beïnvloeden, was het niet meer dan natuurlijk, dat men de oorzaak voor de emigratie bij ontsteking ging zoeken in speciale bacterieproducten, die een aantrekkende, z.g. chemotactische werking op de witte bloedlichaampjes zouden uitoefenen. Als een meer verwijderde werking dezer bacterieproducten zou dan te beschouwen zijn een prikkel op de bloedvormende organen, welke daardoor zouden worden aangezet tot productie van nieuwe witte bloedcellen; de leucocytose bij infectieziekten zou hiervan het gevolg zijn.

Al spoedig daarop kwam men evenwel tot de ontdekking, dat niet alleen bacterien exsudaatvorming kunnen bewerken, maar eveneens vele stoffen, die met bacterien niets te maken hebben, en die de z.n. steriele exsudaten veroorzaken; zulke stoffen waren b.v. ontstekingverwekkend, zooals terpentijn, maar ook eiwitstoffen, amyllum, in 't algemeen stoffen, die aan het lichaam, waarin ze werden ingespoten, vreemd waren, hadden dezelfde eigenschap, en dit werd door vele onderzoekers toegepast, teneinde een voldoende hoeveelheid leucocyten te verkrijgen. Men moest een analoge chemotactische werking dus ook aan alle dergelijke stoffen toekennen; en dan rest wederom de vraag, waarop die specifieke werking berust.

Van de nieuwere onderzoekers, die zich met het emigratieprobleem hebben bezig gehouden, noem ik in de eerste plaats SCHWYZER ¹⁾, die in een reeks publicaties de geldrollenvorming der roode bloedlichaampjes en de amoëboïde bewegelijkheid der witte bloedlichaampjes behandelt. Zooals reeds eerder is aangehaald, kent hij hierbij aan de concentratie van de H- en OH-ionen een grooten invloed toe; verhooging van het aantal

¹⁾ Biochem. Zeitschrift 1914 Bd. 60, p. 297, 306, 447, 454.

OH-ionen binnen vitale grenzen zou de vitale processen in de leucocyten versterken, terwijl toename van het aantal H-ionen in omgekeerden zin zou werken. Hij neemt nu aan, dat onder den invloed van processen in den ontstekingshaard, dus van abnormaal leven, het normale potentiaalverschil tusschen het bloed (+) en de omgeving tot en met de binnenkant van het vaatendotheel (—) grooter wordt; daarbij zou n.l. de negatieve lading van de endotheellaag sterker worden, de + geladen leucocyten zouden daardoor worden aangetrokken naar de randzône, onder versterkte amoeboïde bewegelijkheid, daar deze onder den invloed van hogere OH-ionen-concentratie toeneemt. De pseudopodien zullen de richting van het potentiaalverschil volgen, d.w.z. door de scheiding tusschen de endotheelcellen zich wringen; op deze wijze zou de richtende invloed bij de emigratie verklaard zijn. Ook het verdere wandelen door de weefsels zou, behalve door chemotaxis (hetwelk trouwens slechts een naam is), hierdoor verklaard kunnen worden.

Een dergelijke theorie heeft veel voor; er is ook geen verklaring te denken, waarbij het richtingsprincipe der emigratie beter tot zijn recht komt, dan door het aannemen van een potentiaalverval, dat de anders naar alle richtingen gaande pseudopodien richt, zooals VERWORN een galvanotaxis vond voor amoeben onder invloed van den constanten stroom.

Zooals reeds op p. 110 werd opgemerkt, zoeken FRIEDEMANN en SCHÖNFELD verband tusschen de emigratie en het door hen gevonden feit, dat de leucocyten alleen in sterk visceuze vloeistoffen op het dekglas kunnen kruipen. Reeds vroeger heb ik getracht aan te toonen, dat hun proeven niet bewijzen, dat de groote viscositeit de amoeboïde bewegelijkheid qua talis beheerscht. Nu is wel is waar hun wijze van proefnemen wel eenigermate te vergelijken met de emigratie in het lichaam,

waar de wanden der capillairen en der bindweefselspleten ook een soort onderlaag vormen. Maar toch is aan den anderen kant een kwartslaag geheel iets anders dan lichaamscellen; de wisselende spanningsverhoudingen van het levende weefsel zullen hier een overwegenden invloed hebben, die bij het kwarts ontbreekt, en het is dus zeer zeker niet zonder meer geoorloofd, ook voor het levende weefsel te onderstellen, dat de beweging alleen mogelijk is in sterk visceuze vloeistoffen, en hierin het nuttige effect te zien van het hooge eiwitgehalte van het exsudaat, daar de lymfhe te weinig eiwit zou bevatten.

Verder wijzen deze schrijvers op de mogelijkheid, dat de verminderde viscositeit van de omgeving tegenover het bloed de emigratie zou kunnen veroorzaken¹⁾; dit is evenwel in strijd met hunne meening, dat juist een hooge viscositeit voor de pseudopodienvorming noodig zou zijn; enkele bladzijden vroeger²⁾ deelen ze dan ook mee, dat alleen stoffen, die vloeistoffen sterk visceus maken, in 't algemeen chemotactisch kunnen werken³⁾.

Trouwens, wanneer we naast de vele over emigratie verrichte onderzoekingen ook de mijne nagaan, zullen we moeten erkennen, dat de viscositeit van de toegediende vloeistof geen beslissende factor kan zijn.

M. BÜRGER en H. DOLD⁴⁾ gingen den invloed na, door eiwitten op de leucotaxis uitgeoefend, d.w.z. de plaatselijke

¹⁾ l.c. p. 326.

²⁾ l.c. p. 324.

³⁾ Beter zou men, zooals ook mijne proeven wel aanduiden, kunnen meegaan met de verderop door de schrijvers uitgesproken meening, dat de phagocytose een meer van het leven onafhankelijk phenomeen is dan b.v. de amoeboïde beweging; zij vergeten daarbij echter, dat de phagocytose in principe niet verschilt van de door hen beschreven adhaesie aan de glasplaat.

⁴⁾ Zeitschr. f. Imm. Forschung, Originale Bd. 21 1914, p. 378.

ophooping van leucocyten door een chemischen prikkel. Zij gebruikten daarvoor de injectie van de betreffende stoffen in het kniegewricht van konijnen, en telling van het aantal bloedlichaampjes in het op die wijze verkregen exsudaat. Ze vonden nu: 1) geen noemenswaarde emigratie van polynucleaire leucocyten na injectie van het serum van dezelfde diersoort. 2) Sterke exsudaatvorming door gefiltreerde NaCl-extracten van bacterien. 3) Nog sterker exsudaatvorming, door in te spuiten serum, dat met bacterien was gedigereerd, en geringer, als gebruikt werd inactief serum. 4) Er kwam bij inspuiting van serum-bacterien-extracten geen werking, als vooraf dezelfde vloeistof intraveneus of intraperitoneaal was ingebracht. De schrijvers zijn daarom van meening, dat bacterieextracten in groote concentratie de leucocytenbewegelijkheid remmen; ze staan daarbij op het standpunt, dat sterke phagocytose is een uiting van leucocytenbewegelijkheid.

Zij zijn van meening, dat de leucotactische werking het gevolg is van eiwitsplitsingsproducten, welke optreden na de injectie van soortvreemd eiwit. Bij de vertering van dit eiwit (bacterien) door leucocyten zouden sommige leucocyten te gronde gaan. Opmerking verdient nog, dat de schrijvers de leucotaxis bepaalden door telling van het aantal witte bloedlichaampjes per eenheid van volume, zonder daarbij het geheele volume van het exsudaat in aanmerking te nemen.

In een latere mededeeling ¹⁾ publiceert DOLD als verdere resultaten, dat verschillende orgaanextracten leucotactisch werken, maar in verschillende intensiteit; zoo ook secreten, van het lichaam zelf afkomstig (gal, urine); op grond hiervan is hij van meening, dat de steriele traumatische ontsteking, zooals die b.v. optreedt

¹⁾ Deutsch. Arch. f. Klin. Med. **117**, p. 206.

na injectie van bepaalde stoffen, in de eerste plaats het gevolg is van het weefselvocht, dat door laesie der weefsels uit zijn gepraeformeerde kanalen treedt, en leucotactisch zou werken. De leucocytose bij icterus en uraemie wordt op analoge wijze verklaard, de spijsverteringsleucocytose door de vermeerderde lymphestroom; overal zouden in vermeerderde hoeveelheid eiwitplitsingsproducten den prikkel vormen. Op deze zeer ver gaande conclusies is m.i. de gegronde aanmerking te maken, dat het identificeren van weefselextracten met lympe zeer gewaagd is; en waarom alleen vermeerdering van lymphestroom leucocytose zou geven, is ook niet duidelijk, daar toch dezelfde prikkel voortdurend aanwezig is.

Gedurende mijn eigen onderzoekingen kreeg ik, zij het ook zijdelings, herhaaldelijk den invloed van verschillende stoffen op exsudaatvorming en emigratie te zien. Hoewel het doel van het onderzoek in andere richting ging, leveren toch de zeer talrijke insputtingen, die ik met verschillende stoffen verrichtte, zeker eenig materiaal op voor de onderhavige kwestie.

SCHWYZER onderstelt, dat het pathologische leven door het hogere potentiaalverschil, dat het in het leven roept, chemotactisch werkt. Als dat waar is, zal men kunnen onderstellen, dat injectiemateriaal, dat zooveel mogelijk de bloedvloeistof nabij komt, met eenige waarschijnlijkheid het geringste exsudaat zal geven; dat dit zoo zou kunnen zijn, is evenwel slechts een mogelijkheid, geen noodzakelijkheid: immers de bloedvloeistof is voor het weefsel geen natuurlijk milieu, en zou dus daar wel aanleiding kunnen geven tot wat SCHWYZER noemt pathologisch leven.

Nu vond echter DOLD werkelijk, dat serum van hetzelfde dier geen aanleiding geeft tot exsudatie van cellen.

Zelf heb ik het totale volume van het verkregen cellige exsudaat bepaald door de haematokrietmethode, door n.l. van de totale (gemeten) vloeistof een geringe hoeveelheid in een haematokriet te centrifugeeren, zóó het celvolume te meten en om te rekenen op de geheele vloeistofhoeveelheid; daar ik meestal de buikholte nog naspoelde met NaCl 0.9 ‰, kan ik wel rekenen, dat ik in den regel een vrij zuiver beeld kreeg van de hoeveelheid exsudaat, zuiverder in elk geval dan DOLD.

Op mijne proeven kan desnoods de aanmerking worden gemaakt, dat ze grootendeels plaats vonden aan konijnen, die voor hetzelfde doel reeds eerder waren gebruikt, en dus als 't ware reeds waren voorbehandeld; ik heb evenwel niet kunnen opmerken, dat, behoudens snellere reactie, de exsudaatvorming bij herhaalde inspuiting anders verliep. Verder had ik geen gelegenheid, de gevolgen van inspuiting van het serum van de eigen diersoort na te gaan, ook al wegens de groote hoeveelheid serum, die door de inrichting van mijne proeven daarvoor noodig zou zijn.

Wel kan ik in 't algemeen constateeren, dat ik weinig verschil heb kunnen ontdekken tusschen de verschillende gebruikte stoffen. Ik nam amylumsuspensie, daarna stijfsel, later zuivere NaCl 0.9 oplossing, steeds geschiedde de exsudatie op dezelfde wijze en in vrijwel gelijke intensiteit. Later heb ik twee gelijksoortige konijnen tegelijk ingespoten, een met ultrafiltraat van runderserum, het andere met NaCl 0.9; later met ultrafiltraat, verdund met konijneserum, met NaCl 0.9 en ultrafiltraat, waarin was opgelost 7 ‰ gummi arabicum. Op deze wijze trachtte ik voorwaarden te scheppen, waaronder op grond van een der genoemde theorieën, emigratie achterwege zou moeten blijven. Immers sommige waren bijna physiologisch te noemen, andere (b.v. met gummi arabicum) hadden een hooge viscositeit, waarbij

volgens FRIEDEMANN en SCHÖNFELD de emigratie niet tot stand zou komen. Dit exsudaat kwam echter altijd prompt, en in slechts weinig varierende hoeveelheid.

Ik haal hier b.v. een paar proeven aan:

Van 3 konijnen wordt het eerste ingespoten met 200 cc. NaCl 0.9, het tweede met 200 cc. NaCl 0.9 + gummi arabicum 7⁰/₁₀, het derde met ultrafiltraat van runderserum, waarin gummi arabicum 7⁰/₁₀. Na 5 uur worden de suspensies weer afgetapt, en bevatten het volgende volume leucocyten: Konijn I 0.25 cc. Konijn II 0.256 cc. en konijn III 0.3116 cc. Voor de volumebepaling verkleinde ik door centrifugeeren de suspensie tot een klein volume, en voegde van de zoo verkregen dikke suspensie een klein volume, n.l. 0.08 cc., in een haematokriet van 0.04 cc.; hierin bepaalde ik het volume der bloedlichaampjes van deze 0.08 cc. en wist dan dus, welk procent van de totale suspensie door bloedlichaampjes werd ingenomen.

2 konijnen op dezelfde wijze ingespoten met NaCl 0.9 en ultrafiltraat van runderserum.

De na 5 uur verkregen suspensies bevatten bij konijn I 0.45 en bij konijn II 0.5 cc. leucocyten.

2 konijnen ingespoten resp. met 200 cc. NaCl 0.9, bevattende $\frac{1}{3}$ konijneserum en met ultrafiltraat rund, bevattende $\frac{1}{3}$ konijneserum. Deze inspuiting wordt den volgenden morgen herhaald, en nu bevatten de eenige uren later verkregen suspensies bij konijn I (serum-NaCl): 1.1 cc. en bij konijn II (serum-ultrafiltraat): 2.3 cc. leucocyten.

Alleen in de laatste proef is dus een frappant verschil aanwezig; hier geeft juist de oplossing, waarvan men zou verwachten, dat zij het meest normaal zou zijn, n.l. ultrafiltraat, verdund met serum, een zeer sterke emigratie.

Overigens blijkt in al de proeven geen enkele invloed, die de exsudaatvorming in het ooglopend bevordert.

Zooals reeds boven werd opgemerkt, dienen deze proeven zeer zeker herhaald te worden, omdat de resultaten niet onaanvechtbaar zijn; *de door mij gevolgde methode evenwel lijkt mij*

zeer geschikt, om voor chemotactische proeven goed vergelijkbare cijfers te verkrijgen bij voldoende onderzoekingsmateriaal. Wel moeten dan de onderzochte dieren onder gelijke omstandigheden verkeer en voor het eerst gebruikt zijn. Eerst dan zal men een indruk kunnen krijgen over al of niet chemotactische invloeden van amyllum, suikers enz. tegenover serum, zuivere NaCl 0.9 enz.

Voorloopig wil het me echter toeschijnen, dat injectie van elke vloeistof op een plaats, waar deze vloeistof physiologisch niet aanwezig is, een prikkel vormt tot exsudaatvorming; het is dan wel het eenvoudigst aan te nemen, dat de gewijzigde levensverhoudingen der plaatselijk aanwezige cellen (endotheelcellen, cellen der bindweefselspleten) een grooter potentiaalverschil zullen te voorschijn roepen, dat de exsudatie tot gevolg heeft.

S a m e n v a t t i n g.

Als we het in dit hoofdstuk behandelde nog eens in het kort samenvatten, kunnen we in de eerste plaats constateeren, dat hieruit voldoende blijkt, *dat phagocytose en amoeboïde bewegelijkheid in den grond verschillende processen zijn; de phagocytose zou ik willen noemen een proces van statischen aard, een soort evenwichtsreactie, die tot stand komt onder den invloed van leucocyt, milieu en object van phagocytose, waarbij men zich den leucocyt als een bepaalde onveranderlijke factor kan denken. De amoeboïde beweging speelt zich in hoofdzaak af tusschen de leucocyten en hun omgeving, en hierbij moet juist aan den voortdurend wisselenden toestand van het witte bloedlichaampje een belangrijke rol worden toegekend. Beide processen zullen vaak in intensiteit samengaan, maar het verschillend karakter blijkt bij nader onderzoek direct: de phagocytose wordt in hooge mate beïnvloed door den aard van het*

object van phagocytose, de amoeboïde bewegelijkheid in het minst niet; de phagocytose ondergaat zeer duidelijk den invloed van Ca-ionen in de vloeistof, terwijl deze voor amoeboïde bewegelijkheid geen duidelijke beteekenis hebben; daarentegen wordt de amoeboïde bewegelijkheid in colloïdvrij milieu als 't ware opgewekt door HCO_3 -ionen. In welken zin dit hierbij werkzaam is, hierover verspreiden mijne proeven nog geen nader licht; in elk geval is het niet de eenige factor; colloïde stoffen kunnen eveneens de pseudopodienvorming te voorschijn roepen. Zooals blijkt met een oplossing van gummi arabicum; een analoge werking zullen ook de colloïde stoffen van het serum uitoefenen. Van zeer groot gewicht is een bepaalde H-ionenconcentratie van het milieu; deze kan evenwel in een colloïdhoudende vloeistof lager zijn dan in een colloïdvrij milieu; een iets te groot aantal H-ionen heft echter steeds de amoeboïde beweging op.

In dit verband moge hier de meening van L. HIRSCHFELD¹⁾ vermeld worden, die de amoeboïde beweging tracht te verklaren als een gevolg van een ladingsverschil ten opzichte van een voorwerp (b.v. bacterie) in de omgeving; hij verkondigt daarbij de meening, dat H-ionen door verlaging van de oppervlaktespanning de amoeboïde bewegelijkheid zouden verhoogen, en grondt deze opvatting o. a. hierop, dat bij osmiumzuurfixatie tengevolge van deze H-ionen een sterker pseudopodienvorming zou optreden dan door andere fixatiemiddelen. De onjuistheid van deze opvatting is zonder meer duidelijk; immers het is zeer goed bekend, en mijne proeven bewijzen het, dat een iets te groot aantal H-ionen, hetzij dan veroorzaakt door zoutzuur, osmiumzuur of een ander zuur, direct de amoeboïde bewegelijkheid geheel doet ophouden; verder legt osmiumzuurfixatie alleen uitloopers daar vast, waar ze uit anderen hoofde reeds aanwezig waren.

¹⁾ Zeitschr. f. allgemeine Physiol., 9, p. 528.

De invloed van het milieu op de pseudopodienvorming laat zich het best aantonen door fixatie in de vrije vloeistof; het zien voortbewegen onder het dekglas is voor dit doel minder geschikt, omdat hierbij het nieuwe oppervlak invloed zal uitoefenen. Het derde oppervlak zal n.l. de oppervlaktespanning wijzigen, en daardoor in elk geval een uitspreiding van de cel bewerken, welke met amoeboïde bewegelijkheid niet verward moet worden.

Zoo vermeldt ook TAIT ¹⁾, dat bij Crustaceen de cellen, die overeenkomen met de bloedcellen der hoogere dieren, kunnen worden verdeeld in z.n. „thigmocyten” en in gegranuleerde cellen. De eerste vloeien uit op een vlak oppervlak, maar hebben niet de „kracht”, dan hun protoplasma voort te bewegen; dit laatste kunnen wel de gegranuleerde cellen, en wel in dien zin, dat de amoeboïde beweging van de cellen van deze invertebraten evenredig lijkt met het aantal (eosinophile) granula; het uitvloeien alleen is geen vitale eigenschap.

We mogen hieruit afleiden, dat de granula de celprocessen mogelijk maken, die de amoeboïde bewegelijkheid tengevolge hebben.

Wat betreft de „gerichte amoeboïde bewegelijkheid”, welke de emigratie uit de bloedbaan bewerkt, hieromtrent leerden mijne proeven, dat alle, ook physiologische vloeistoffen, in de buikholte gebracht, deze emigratie in ongeveer dezelfde mate veroorzaken. Het komt mij waarschijnlijk voor, dat hier een potentiaalverschil met het bloed een belangrijke rol speelt.

Daar dus de amoeboïde bewegelijkheid naar allen schijn te voorschijn komt onder den invloed van celprocessen, is er alle aanleiding, de stofwisselingsverschijnselen der leucocyten nader te onderzoeken.

¹⁾ Quarterl. Journ. of Exp. Physiol. 12, 1—33; geciteerd uit Physiol. Abstr. III, p. 167, No. 857.

HOOFDSTUK III.

STOFWISSELINGSVERSCIJNSELEN DER WITTE BLOEDLICHAAmpjes.

Aan de stofwisselingsverschijnselen in de leucocyten wordt algemeen een groote beteekenis toegekend, en zulks niet in de eerste plaats in verband met de amoeboide beweging, maar vooral met het oog op de intensieve fermentwerking, die deze cellen doen zien. Zonder een dergelijke fermentwerking zou toch de amoeboide bewegelijkheid en de phagocytose, hoe belangrijk op zich zelve, bij de bestrijding der infecties geen effect kunnen hebben, omdat ten slotte de strijd tusschen het eene leven en het andere den doorslag zal moeten geven. Op de vraag, waar zich de fermentwerking in hoofdzaak zal afspelen, in of buiten de cel, hoop ik in een volgend hoofdstuk nog terug te komen; deze vraag is van belang voor de beteekenis, die we aan het leven van het witte bloedlichaampje moeten toekennen bij de bestrijding van infectieprocessen.

Van de verschillende fermentwerkingen, welke men in de laatste jaren bij de witte bloedlichaampjes heeft gevonden, zijn wel het meest bekend geworden de oxydasen (reducasen) en de proteolytische fermenten. De neutrophiele leucocyten hebben zich als een der celsoorten geopenbaard, welke de oxydasereactie het duidelijkst geven, en deze uitgesproken oxydatieve werking moet evenals de proteolytische, tot de

meest werkzame strijdmiddelen dezer cellen behooren. Ook verschillende fermentsoorten, welke de koolhydraten splitsen, zijn in de leucocyten gevonden.

Op deze laatste groep, die ongetwijfeld ook van groote beteekenis moet zijn, was in de eerste plaats mijn aandacht gevestigd, en wel vanwege het *glycogeengehalte der leucocyten*.

1. ONDERZOEK OVER HET GLYCOGEENGEHALTE DER WITTE BLOEDLICHAAMPJES.

a) *De jodophilie der leucocyten.*

Het glycogeen, dat in de lichaamscellen vrijwel algemeen wordt aangetroffen, zal in vele gevallen daar voor de stofwisseling een zeer belangrijke rol vervullen, terwijl in andere gevallen de aanwezigheid dezer stof niet in de eerste plaats is te beschouwen als een gevolg van celwerkzaamheid, maar van celdegeneratie. De cel kan dus in het eene geval het glycogeen afzetten als voorraadkoolhydraat, dat voortdurend verbruikt wordt, waarbij de cel dus volle levenswerkzaamheid ontplooit; daartegenover zien we in andere cellen opeenhooping van glycogeen, terwijl we moeten aannemen dat ze in den toestand van necrobiose verkeerden (afstervende epitheelcellen, snel groeiende tumoren).

Mijn aandacht werd toevallig op de aanwezigheid van glycogeen gevestigd, toen ik aan een druppel exsudaatcellen van het konijn, welke ik amyllum had laten opnemen, op de gebruikelijke wijze op het objectglas een druppel J.J.K-oplossing toevoegde voor de amyllumkleuring. Direct viel me nu de sterke bruinkleuring, ja bruinzwartkleuring op van de leucocyten-granula, ja, in vele gevallen bleef zij niet tot deze granula beperkt, maar kleurde ook het geheele protoplasma min of

meer mahoniebruin, waartusschen dan de gele kern veelal als een lichter plekje zichtbaar bleef. Bij de leucocyten van het paard was ik dit verschijnsel nooit tegengekomen, hier werden de bloedlichaampjes hoogstens geel gekleurd.

Tusschen de bruine gegranuleerde cellen teekenden zich bij de exsudaatleucocyten de niet gekleurde, veel meer doorschijnende mononucleaire cellen zeer scherp af.

Het zou nu mogelijk zijn, dat we hier alleen te doen hadden met een speciale eigenschap van de leucocyten van het konijn, die een gevolg was van het feit, dat de granulatie der neutrophilen bij het konijn veel grover is dan bij andere dieren. In de eveneens grof gekorrelde bloedleucocyten van het konijn vond ik echter die reactie bijna nooit; hij was echter constant weer zeer sterk aanwezig in exsudaatcellen van de cavia en ook van de geit.

Ik overwoog daarop de mogelijkheid, dat ik hier te doen had met een voorbeeld van de bekende *jodophilie* der witte bloedlichaampjes, waarover reeds veel gestreden is, sedert EHRlich¹⁾ er opnieuw de aandacht op vestigde, nadat reeds RANVIER²⁾ had opgemerkt, dat aan witte bloedlichaampjes door behandeling met Jodiumoplossing bruine druppeltjes zich afscheiden. EHRlich gaf de methode aan, om microchemisch in het gefixeerde preparaat het glycogeen aan te toonen door middel van de Jodiumreactie: hij loste daarvoor in de oplossing van LUGOL gummi arabicum op tot stroopconsistentie, en hoopte op deze wijze de bekende oplosbaarheid van het glycogeen in water tegen te gaan.

¹⁾ Zie o. a. EHRlich u. LAZARUS: Die Anämie, in Nothnagel's; Pathologie und Therapie, 1899.

²⁾ Progrès medical etc. 1877, p. 422.

Waar het nu bleek, dat de reactie in ettercellen meestal positief is, daarentegen in het normale bloed slechts zelden en dan nog slechts bij enkele cellen, was EHRLICH van meening, dat de witte bloedlichaampjes bij het verlaten van de bloedbaan een eigenaardige verandering ondergaan, die zich o. a. zou uiten in het optreden van glycogeen na eenigen tijd.

In de jaren tusschen 1890 en 1905 hebben zich nu een groot aantal onderzoekers bezig gehouden met het vraagstuk, of in het bloed de glycogeenreactie al of niet normaal aanwezig is; reeds spoedig na EHRLICH's mededeeling achtte men n.l. de aanwezigheid van een groot aantal jodophile cellen in het bloed een bewijs, dat ergens in het lichaam een etterhaard of infectieproces voorhanden was, daar men ontdekte, dat sterke jodophilie vaak samenging met een infectieproces. Men ging daarop de jodophilie beschouwen als een reactie der leucocyten op de infectieoorzaak, en wel op de aanwezigheid van specifieke bacterieproducten; het was vooral KAMINER¹⁾, die deze meening uitte op grond van uitgebreide onderzoekingen. Toen evenwel bleek, dat jodophilie in het bloed eveneens optrad na steriele abcessen, moest men ook aan de stoffen, welke deze laatste veroorzaken, dezelfde werking toeschrijven.

Er ontspon zich nu een verwarrend dispuut over de waarde der reactie als differentieel diagnosticum tusschen verschillende infectieziekten en bij sommige bloedziekten. De verwarring werd mede veroorzaakt door het zeer wisselende resultaat, dat de Joodreactie geeft, naarmate zij op verschillende wijzen wordt toegepast, hetzij volgens EHRLICH met Joodgummi, of wel met Joodglycerine, op welk verschijnsel A. WOLFF²⁾ de

1) Zie o. a. Berl. Klin. Woch. 1899, No. 6.

2) Zeitschr. f. Klin. Med. 51, p. 407—427.

aandacht vestigde. Het vraagstuk werd nog ingewikkelder, omdat een deel der onderzoekers ging betwijfelen, of de jodophilie der leucocyten in het bloed wel een reactie op glycogeen was; zoo hielden A. CZERNY¹⁾ en onder anderen ook ZOLLIKOFER²⁾ de stof, die hier de reactie veroorzaakte, voor een voortrap van het amyloid.

ZOLLIKOFER gaf verder een gewijzigde methode voor de reactie aan, door n.l. het bloed nog vochtig aan Jodiumdampen bloot te stellen, en verkreeg dan een positieve reactie bij nagenoeg alle witte bloedlichaampjes, ook in normaal bloed. A. WOLFF bevestigt dit, maar is van meening, dat de reactie wel degelijk op glycogeen betrekking heeft; hij stelt zich verder voor, naar aanleiding van de positieve reactie volgens ZOLLIKOFER, dat het glycogeen in alle witte bloedlichaampjes aanwezig is, maar in het normale bloed in zeer oplosbaren toestand, zoodat reeds het uitdrogen van het preparaat (bij de reactie volgens EHRLICH toegepast) de oplossing er van uit de cel ten gevolge zou hebben. In pathologische gevallen echter, zooals in etter, en bij infecties ook in het bloed, zou het glycogeen als het ware „verfestigt” worden, dus minder oplosbaar zijn, en dan ook met de gewone methode van EHRLICH aantoonbaar zijn. WOLFF beschouwt dit pathologisch minder oplosbaar worden van het glycogeen, dus de jodophilie volgens de gewone methode, als een bewijs van beginnende celdegeneratie; deze meening zijn trouwens ook ZOLLIKOFER en de meeste onderzoekers toegedaan: ik noem daarvan alleen KATSURADA³⁾ en verder vooral SOROCHOWITSCH⁴⁾, welke laatste

¹⁾ Arch. f. Exp. Path. u. Pharm. 31, p. 190.

²⁾ Inaugural. Dissert. 1899 Bern.

³⁾ ZIEGLER's Beitr. 32, 173—192.

⁴⁾ Zeitschr. f. Klin. Medizin 51, p. 245—286, 1903.

in een uitvoerig literatuuroverzicht verder den stand der kwestie aangeeft. Volgens WOLFF zou dan bij voortschrijdende necrobiose al het glycogeen ten slotte weer uit de cel verdwijnen; daarop zou het verschijnsel berusten, dat in oude etter de glycogeenreactie vaak negatief is. Als tegenhanger van deze meening waren EHRLICH zelf, en bijv. ook BEST¹⁾ van oordeel, dat de toestandsverandering in den leucocyt, die aanleiding geeft tot de glycogeenreactie, een teeken is van verhoogde celwerkzaamheid tengevolge van een prikkel. BEST vond b.v. in coupes van een infectiehaard de reactie positief in alle cellen in de omgeving van den haard, welker aanwezigheid beschouwd kon worden als een reactie van het weefsel op den ontstekingsprikkel.

We zien dus groote meningsverschillen, en deze zijn ongetwijfeld een gevolg hiervan, dat de microchemische bruinkleuring door Jodium als reactie zeer wisselvallig is, en verder niet de aan- of afwezigheid van glycogeen in de cel bewijst. Men weet nog zeer weinig omtrent de wijze, waarop het glycogeen in de cel aanwezig is. Men heeft opgemerkt, dat, terwijl het glycogeen op zich zelf in water oplosbaar is, toch in de coupes van verschillende preparaten deze oplosbaarheid zeer verschillend sterk tot uiting komt. Men heeft daarom onderscheid gemaakt tusschen z.n. oplosbaar en onoplosbaar glycogeen, afhankelijk van een verschillend sterke binding aan bepaalde celbestanddeelen: in verschillende cellen zou het nu in verschillende modificaties aanwezig zijn. Zoo wordt in EHRLICH's „Encyclopädie der Mikroskopischen Technik” in het artikel over glycogeen door LUBARSCH dit onderscheid gemaakt, en, waarschijnlijk op grond van het verloop van de microscopische

¹⁾ ZIEGLER's Beiträge Bd. 33. 1903.

glycogeenreactie, door verschillende onderzoekers vermeld, weefsels en organen in dit opzicht in rubrieken gescheiden; de leucocyten zouden volgens deze indeeling, waarschijnlijk afgaande op de vroeger aangehaalde publicatie van WOLFF, zeer oplosbaar glycogeen bevatten.

Dat de meerdere of mindere oplosbaarheid niet alles kan verklaren, geloofde reeds BEST¹⁾; hij is van meening dat het glycogeen in de cel veelal niet aanwezig is als zuiver glycogeen, maar minder of sterker gebonden aan een „Trägersubstanz”. Verder wijzen ook MAX BLEIBTREU en KAN KATO²⁾ er op, dat afhankelijk van de stof, waarmee het glycogeen gebonden is, de microscopische Jodiumreactie soms kan uitblijven, ook als door chemische analyse is aangetoond, dat glycogeen zelfs tot procenten aanwezig is.

We kunnen daaruit de gevolgtrekking maken, dat een negatieve Jodiumreactie geen bewijs is voor de afwezigheid van glycogeen; maar we hebben boven gezien, dat ook de positieve bruinkleuring door Jodium op zich zelf nog niet de zekerheid geeft, dat deze door glycogeen wordt veroorzaakt. Zoo wijst NEUKIRCH³⁾ er op, dat de verschillende methoden voor microscopisch aantoonen van glycogeen vaak verschillend resultaat geven; zoo is bij leucocyten ook met duidelijke jodophilie de karmijnkleuring volgens BEST steeds negatief. Een positieve reactie zal alleen voor glycogeen bewijzend zijn, als na behandeling met speeksel of diastase de reactie verdwijnt.

Na laatstgenoemde publicatie kon ik in de litteratuur over de jodophilie der leucocyten geen werken vinden, die een

¹⁾ l. c.

²⁾ PFLÜGER's Arch., No. 127, p. 118—142.

³⁾ Zeitschr. f. Klin. Medizin, 70, p. 251—256.

ander inzicht gaven. Alleen vond ik nog een artikel van REISZ ¹⁾, die naar aanleiding van een onderzoek over de jodophiele stof in gonorrhoeische etter als zijn meening verkondigt, dat de jodophiele substantie niet identiek is met glycogeen, en verder niet een uiting van een degeneratief proces, maar van een verhooging der biologische celprocessen.

Waar het glycogeen een reservestof is, die als colloïd de protoplasmamembraan zeer zeker niet zal passeeren, is de meening van WOLFF, dat bij de normale bloedleucocyten het voorhanden glycogeen reeds bij het uitdrogen van het preparaat zeer snel zou oplossen in de omgeving, niet houdbaar.

Dat in werkelijkheid die oplosbaarheid ook bij z.n. oplosbaar glycogeen nog niet zoo heel groot is, daarvan kan men zich gemakkelijk overtuigen, als men van een in alcohol gefixeerde lever met duidelijke glycogeenreactie coupes maakt, en deze deels in alcohol, deels in water, en daarnaast ter controle in speeksel gedurende verscheidene uren op 37° C. laat liggen. Terwijl door het speeksel al het glycogeen verdwijnt, is in het water nog slechts zeer weinig glycogeen uitgetrokken; de bruinkleuring door opdruppelen van J.J.K.-oplossing is ook dan nog zeer sterk. Dus ook in deze zeer dunne coupes houdt het protoplasma der cel, zelfs als het door de fixatie niet meer impermeabel genoemd kan worden, het glycogeen nog vrij sterk vast.

Hoe weinig waarde de Jodiumreactie verder op zich zelf heeft, wordt ook duidelijk, als men ziet, hoe volgens de Jodiummethode van EHRLICH, evenals door die van ZOLLIKOFER, ook de roode bloedlichaampjes bruinzwart worden, wat door velen

¹⁾ Przegl. lekarski, 1917, 2—3; geciteerd naar het Ref. in: Jahreskurse f. ärztliche Fortbildung, 1918, Rundschau.

ook glycogeen wordt genoemd, terwijl hier toch zeker geen glycogeen, anders dan in onbeteekenende spoortjes, aanwezig is.

Uit al het voorafgaande blijkt wel voldoende, dat met de microscopische Jodiumreactie, zelfs gecombineerd met de speekselcontrôle, het vraagstuk van het glycogeengehalte der witte bloedlichaampjes niet tot oplossing kan worden gebracht. Toch blijft het interessant, dat de leucocyt zich alleen onder bepaalde omstandigheden bruin kleurt met Jodium en in andere weer niet; dat wijst in elk geval op toestandsveranderingen der leucocyten.

Om over de rol, die hierbij het glycogeen speelt, beter te kunnen oordeelen, is het noodig, om de hoeveelheid glycogeen ook chemisch te bepalen.

Door chemische analyse gelukte het reeds SALOMON¹⁾ en later ook HUPPERT²⁾ uit etter glycogeen zuiver te bereiden. Bij het onderzoek van bloed evenwel bleken de door verschillende onderzoekers verkregen waarden zeer uiteenlopend. KAUFMANN³⁾ vond meestal een geringe hoeveelheid van 10—25 mgr. per Liter in het bloed van verschillende normale dieren, en verder een sterke vermeerdering bij diabetes. Andere onderzoekers evenwel kregen in 't bloed negatief resultaat. In de overwegende meerderheid der gevallen werd in het bloed het z.n. glycogeengehalte der witte bloedlichaampjes alleen bepaald aan de jodophilie.

Toen ik zelf de jodophilie der exsudaatleucocyten het eerst zag, overwoog ik de mogelijkheid, of we hier misschien te

¹⁾ Zentr. Bl. f. Physiol. 1892, p. 512.

²⁾ " " " " 1892, p. 394.

³⁾ Comt. rend. Soc. d. Biol. 47. 665—666.

doen hadden met een glycogeenafzetting in de leucocyten onder den invloed en als gevolg van een omzetting van het ingespoten zetmeel (resp. stijfsel). Een dergelijke omzetting neemt b.v. ZABOLOTNY ¹⁾ aan op grond van een onderzoek over de zetmeelresorptie na intraperitoneale inspuiting daarvan; verder eveneens OKASAKI ²⁾, die het lot van in de bloedbaan ingespoten amyllum naging. Als de glycogeenafzetting veroorzaakt of ten minste versterkt werd bij aanwezigheid van zetmeel, zou dit een duidelijke aanwijzing zijn, dat de jodophilie qualis niet een uiting is van degeneratie van het witte bloedlichaampje. In het eerst gebruikte ik, om dit te onderzoeken, de intensiteit van de bruinkleuring als een (zij het ook ruwe) maatstaf; al spoedig bleek daarbij echter, dat de jodophilie in alle exsudaatleucocyten aanwezig was, ook al was het exsudaat slechts enkele uren oud, en op het eerste gezicht niet door de al of niet aanwezigheid van stijfsel werd beïnvloed; immers ook in exsudaten na injectie van zuivere oplossing van NaCl 0.9 was de reactie oogenschijnlijk onverminderd. Waar de reactie zoo snel optrad, leek hier de meening van EHRLICH, dat de leucocyt buiten de bloedbaan een eigenaardige verandering ondergaat, met de werkelijkheid overeen te komen. Ik bepaalde mij als regel tot het verrichten der reactie in een druppel van de suspensie zelf door toevoeging van een kleine druppel van de onverdunde oplossing van LUGOL (J 1, KJ 2, aq. dest. 100), dus analoog aan de vochtige kleuring volgens ZOLLIKOFER, met dit verschil evenwel, dat achteraf geen indrogen van het preparaat volgde.

¹⁾ Russ. Arch. f. Path., klin. Med. und Bakt., **9**, p. 402.

²⁾ Sei-I-Kwai Med. J., 1917, **36**, p. 101; geciteerd uit Ref. in Physiol. Abstracts III, No. 910.

Spoedig toont onder den invloed van het J. de leucocyt sporen van cytolysis in dien zin, dat aan het oppervlak bruinviolette bolletjes zich vormen, zooals dat reeds door RANVIER¹⁾ werd opgemerkt. Deze cytolysis blijft evenwel uit, als men den leucocyt eerst fixeert, door toevoeging van een druppel osmium-zuur aan de vloeistof. Hoe moeilijk echter (in tegenstelling met de vroeger aangehaalde meening van WOLFF) uit deze cellen, in levenden of gefixeerden toestand, het glycogeen „oplost”, blijkt wel daaruit, dat zelfs na 24 uur de reactie in beide gevallen nog positief was.

Dat de reactie verder naar alle waarschijnlijkheid werkelijk een glycogeenreactie was, bleek me, doordat na speeksel-behandeling, zij het ook eerst na langeren tijd, de bruinkleuring uit het gefixeerde dekglaspreparaat verdween.

Toch was natuurlijk de microscopische reactie absoluut onvoldoende, om een oordeel te verschaffen over de hoeveelheid glycogeen. De chemische analyse is, zooals gezegd, daarvoor aangewezen, maar bij de kleine hoeveelheden leucocyten, die het exsudaat in de meeste gevallen bevat, is alleen een micro-methode bruikbaar.

b) Micro-methode voor glycogeenbepaling in leucocyten.

Tot dit doel heb ik de gewone methode van PFLÜGER²⁾, om het glycogeen uit de weefsels te ontsluiten, tot een micro-methode omgewerkt, door n.l. de leucocyten met sterke kaliloog te koken, daarna het glycogeen neer te slaan met alcohol en vervolgens het neerslag met alcohol uit te wasschen, dan op te lossen in water, met verdund zoutzuur te koken, en daardoor

¹⁾ l. c.

²⁾ Zie o. a. PFLÜGER's Arch., **129**, p. 362—378.

om te zetten in glucose, en vervolgens de sterkte der zoo verkregen glucoseoplossing met de door BANG¹⁾ aangegeven micromethode te bepalen.

Ik ging daarbij als volgt te werk:

De leucocyten suspensie werd snel één of meermalen met NaCl 0.9 uitgewasschen, en van het sediment weder met behulp van een weinig NaCl 0.9 een dikke suspensie gemaakt; door middel van de haematokrietmethode (zie pag. 130) wordt daarop het volume der leucocyten in deze suspensie bepaald; daarna een bepaalde hoeveelheid der suspensie met een pipet afgemeten in een nauw dikwandig reageerbuisje van $\pm 6-7$ cc inhoud bij een wanddikte van ongeveer 0.75 mM., voorzien van een glazen ingeslepen stop en van een verdeeling in $\frac{1}{4}$ cc., gaande tot 5 cc.; hierin werd nogmaals gecentrifugeerd gedurende een paar minuten, de bovenstaande vloeistof afgegoten en aan het leucocytenzuiltje, waarvan de inhoud gemakkelijk kan worden afgelezen, toegevoegd evenveel kaliloog 60 %, als het leucocytenvolume bedraagt. Vervolgens wordt het buisje nu in een daarvoor geschikt statief met passende openingen geplaatst in een waterbad, en hierin nu met gesloten stop de geheele massa ruim 2 uur lang gekookt. Reeds vrij spoedig is alles nu vervloeid tot een gele vloeistof; daarna wordt afgekoeld, evenveel water toegevoegd als het volume van de vloeistof bedraagt, en vervolgens uit de dan verkregen hoeveelheid het glycogeen neergeslagen door het dubbele quantum absolute alcohol (of alcohol 96 %); bij een hoeveelheid sediment (+ de rest der afgegoten vloeistof) van niet meer dan 0.5 cc. kan de geheele nu beschreven bewerking, zooals trouwens ook alles wat nog volgt, plaats hebben in hetzelfde reageerbuisje, en wordt dus alle overgieten, filtreeren enz. voorkomen. Immers ook na alcoholtoevoeging is in het buisje in dit uiterste geval nog slechts $(0.5 + 0.5) + 1 + 4 = 6$ cc. vloeistof. Het neerslag van glycogeen vormt zich na de toevoeging van alcohol sneller of langzamer; om het zich te laten afzetten, liet ik gedurende den nacht het buisje aan zich zelf over. Daarna wordt den

¹⁾ Hiervoor werd gebruikt de laatste door BANG aangegeven modificatie: zie Bioch. Zeitschr., 87, p. 264, en 92, p. 344.

volgenden dag het sediment eenige malen, door centrifugeeren en afgieten van het sediment, uitgewasschen, eerst met alcohol 66%, daarna alcohol absolutus, aether, en nogmaals alcohol absolutus, en na afgieten van de laatste het buisje wederom, maar nu open, geplaatst in een kokend waterbad; de alcohol verdampt hier in enkele oogenblikken, en het glycogeen blijft als een meestal wit, soms ook door geringe verontreiniging eenigszins grijs gekleurd poeder achter. Nu wordt dit glycogeenresidu opgelost in 1 of meer cc. gedestilleerd water, afhankelijk van de hoeveelheid gebruikt materiaal; het grootste deel van het residu lost in de kokende vloeistof spoedig op. Daarna wordt $\frac{1}{12}$ — $\frac{1}{15}$ van het totale volume aan sterk zoutzuur toegevoegd met een fijnverdeelde pipet, zoodat de vloeistof ± 2 — 2.5% HCl bevat. Hierin wordt de oplossing direct helder. Nu wordt 2—4 uur met gesloten stop opnieuw in het waterbad verhit; na afloop van dezen tijd kan verwacht worden dat het glycogeen quantitatief in glucose is omgezet. Na afkoeling wordt eenigszins geneutraliseerd door ongeveer evenveel NaOH 33% toe te voegen als eerst sterk zoutzuur; de reactie is dan nog even zuur (gecontroleerd met neutraalrood); nu wordt aangevuld tot een geheel aantal cc., en hierin volgens de methode van BANG het aantal mgr. glucose bepaald, hetwelk dan omgerekend wordt op 1 cc. leucocyten.

Voorbeeld: dikke leucocyten suspensie bestaat volgens de haematokrietbepaling voor $\frac{1}{8}$ uit witte bloedlichaampjes. 1 cc. dezer suspensie, dus bevattende 0.125 cc leucocyten, wordt na centrifugeeren en afgieten gekookt met 0.15 cc. KOH 60%, daarna verdund met ± 0.3 cc. water, en dan door 1.2 cc. alcohol absolutus het glycogeen neergeslagen, en den volgenden dag op de beschreven wijze uitgewasschen en gedroogd; vervolgens wordt ter oplossing van het poeder toegevoegd b.v. 0.75 cc. gedestilleerd water, hierbij afgemeten 0.06 cc. sterk zoutzuur en 2 uur lang op het waterbad gekookt. Na neutralisatie met ongeveer 0.06 cc. NaOH 33% wordt met gedestilleerd water aangevuld tot 1 cc. en volgens BANG de reductie bepaald. Deze bedraagt (in glucosegehalte) 0.15%. De vloeistof van 1 cc. bevatte dus 1.5 mgr. glucose, welke afkomstig was van 0.125 cc. leucocyten. In 1 cc. leucocyten was dus aanwezig $8 \times 1.5 = 12$ mgr. glycogeen (in glucose uitgedrukt) of 1.2%. Men kan desgewenscht dit gehalte nog in glycogeen omrekenen door vermenigvuldiging met 0.9, volgens de moleculaire formule berekend.

De methode is zeer eenvoudig. Het groote voordeel is, dat, zooals boven is toegelicht, het geheele procédé zich afspeelt in één buisje, zonder te filtereen, of om te spoelen, als ten minste wordt uitgegaan van een leucocytenhoeveelheid van niet grooter dan 0.5 cc.; voor grooter hoeveelheden kunnen buizen van iets grooter volume worden gebezigd. Het verlies is hierdoor tot een minimum gereduceerd; door de aangebrachte verdeeling kunnen we verder in het buisje zelf de vloeistof aanvullen vóór de eindtitratie.

Natuurlijk overtuigde ik me door de Jodiumreactie, dat het zoo verkregen poeder werkelijk glycogeen was, of liever glyco-geen bevatte. Bij het koken met zoutzuur vormde zich meestal een geringe uitvlokkings van verontreinigingen, zooals ook door PFLÜGER bij de beschrijving van zijne methode wordt aangegeven. Het eenige nadeel is, dat men bij het afgieten van de vloeistof tijdens het uitwasschen vooral tegen het laatst (bij het wasschen met absolute alcohol en aether) zeer voorzichtig te werk moet gaan, omdat men anders door het gemakkelijk loslaten van het sediment van den bodem licht een klein verlies zou krijgen. Dit zal nog verbeterd kunnen worden door de gebruikte buisjes eenigszins in een punt te laten uitloopen, welke het sediment kan bevatten.

Meestal kreeg ik een zeer voldoende overeenstemming van de dubbelproeven; een enkele maal was deze wel eens minder mooi in het begin, wat echter zeer wel het gevolg kan zijn van een verlies als bovengenoemd.

Wel bedroegen de verschillen der dubbelmethode vaak 10%, maar dit is voor een deel zeer zeker te wijten aan het feit, dat bij de nieuwe methode van BANG één druppel van de titratievloeistof meer of minder reeds een aanmerkelijk verschil in het resultaat beteekent. Aan een verschil van 10% heb ik

dan ook nooit eenige waarde toegekend. De methode stelde me in elk geval in staat een vrij nauwkeurige indruk te verkrijgen van de hoeveelheid glycogeen, die in mijne exsudaat-leucocyten voorhanden was.

Om voor de hand liggende redenen koos ik de titratiemethode na hydrolytische omzetting, om de hoeveelheid verkregen glyco-geenpoeder te bepalen. Wegen zou hier wegens de zeer kleine hoeveelheden en de mogelijke verontreinigingen bijna onuitvoerbaar zijn, en zou ook een geheele wijziging van de methode noodzakelijk maken. Ook de polarimetrische bepaling van het glycogeen (resp. de glucose) was bij de onbeteekenende hoeveelheid materiaal onuitvoerbaar.

Wordt nu door de titratie na hydrolytische omzetting inderdaad al het aanwezige glycogeen aangetoond? Hoewel de omzetting door zoutzuur gewoonlijk als quantitatief wordt bestempeld, gelukte het me niet zelfs na 4 uur koken op de voorgeschreven wijze al het glycogeen, dat was gebruikt, terug te vinden. Gewoonlijk moest ik me met 70 %—80 % van de oorspronkelijk gebruikte hoeveelheid tevreden stellen, maar dit resultaat was dan ook vrij constant, daarom vond ik geen reden, om alleen hierom de methode te verwerpen. Dit resultaat blijkt b.v. uit enkele contrôleproeven, waarbij ik van een glycogeen-oplossing van bekende sterkte uitging:

Van een afgewogen hoeveelheid glycogeen maakte ik een oplossing van 0.2 % en een van 0.1 %. Van beide werd op de beschreven wijze 2 cc. met 0.17 cc. sterk zoutzuur gekookt, daarna geneutraliseerd, aangevuld tot 2.5 cc. en getitreerd. Volgens de eerst afgewogen hoeveelheid moest hierin aanwezig zijn glucose berekend naar $\frac{4}{5} \times 0.2 = 0.16$ (resp. $\frac{4}{5} \times 0.1 = 0.08$) % glycogeen, of $\frac{10}{9} \times 0.16 = 0.175$ (resp. 0.0875) % glucose. Gevonden werd hierbij evenwel 0.116 % (gemiddelde van 0.1125 en 0.12 %), resp. 0.059 % (dubbelproeven gelijk).

Dit te geringe bedrag werd constant gevonden, onafhankelijk van het feit, of 2 uur dan wel 4 uur werd gekookt; de overeenstemming, tusschen de verschillende concentraties bereikt, was evenwel, zooals boven blijkt, ruimschoots voldoende.

Zooals gezegd, verschafte de methode me echter een voldoende inzicht in de glycogeenhoeveelheden; immers het constant te lage cijfer kon ik desnoods in rekening brengen, of nog beter, ik kon het glycogeengehalte uitdrukken in de gevonden glucose-reductie, en er dan steeds rekening mee houden, dat bij een zekere hoeveelheid glycogeen deze reductie lager is, dan theoretisch verwacht zou kunnen worden.

c) Het glycogeengehalte van exsudaatleucocyten in verschillende omstandigheden.

Het glycogeengehalte, dat ik op de boven beschreven wijze in mijne exsudaatleucocyten vond, bleek vrij sterk te wisselen. Ik kon daarbij niet een duidelijk uitgesproken invloed van den ouderdom van het exsudaat aantoonen; trouwens hieraan moet ik direct toevoegen, dat deze ouderdom nooit meer dan 3×24 uur bedroeg. Meestal schommelde het gehalte (steeds uitgedrukt in de gevonden glucose) tusschen 1 en 1.5 %, maar in enkele gevallen was het aanmerkelijk hooger tot meer dan 3 %, soms ook bedroeg het slechts ongeveer 0.5 %. Steeds was het een niet te verwaarloozen hoeveelheid. Alleen wezen mijne proeven wel in de richting, dat in de eerste uren na de emigratie het glycogeengehalte toeneemt, zooals bij de volgende proeven nog besproken zal worden.

Om te trachten de vraag te beantwoorden, of het glycogeengehalte opgevat moet worden, als een uiting van actieve celwerkzaamheid, dan wel als een teeken van beginnende

toed van
ging van
se aan de
ievloeistof
et glyco-
ehalte.

degeneratie van de leucocyten, ging ik in de eerste plaats na, of het mogelijk was, het glycogeengehalte te verhoogen, door het konijn in plaats van zuivere NaCl 0.9 in te spuiten een glucose-houdende vloeistof, bijv. NaCl 0.9 + glucose 0.5 %.

Ik ging als volgt te werk: bij een konijn werd ingespoten op de gewone wijze NaCl 0.9 en 4 uur later de suspensie afgehaald en op glycogeengehalte onderzocht; tegelijk werd nu opnieuw ingebracht serum, verdund met 5 deelen NaCl 0.9 en hierbij 0.5 % glucose; twee uur later werd deze suspensie weer afgehaald en eveneens op glycogeen onderzocht. Van beide werden dubbelproeven onderzocht en het resultaat was het volgende: (zie tabel XLVII).

TABEL XLVII.

Vloeistof, in de buikholte gebracht:	Glycogeen- gehalte der dubbelproeven, in % glucose:	Gemiddeld gly- cogeengehalte der leucocyten, in % glucose:	Hoeveelheid verkregen leucocyten:
NaCl 0.9	1.2 % 1.25 %	1.225 %	0.1 cc.
NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{6}$ + 0.5 % glucose	1.41 % 1.68 %	1.54 %	0.5 cc.

Bij het inspuiten van de glucosehoudende vloeistof voegde ik serum toe, om in het nu volgende korte tijdsverloop het eiwitgehalte direct ongeveer even hoog te maken, als het in de juist uitgehevelde suspensie was.

We zouden geneigd zijn, hier werkelijk aan een glycogeen-aanzetting onder den invloed van suiker te gelooven, vooral

ook als we daarbij tabel XLVIII vergelijken, waar het verschil nog duidelijker spreekt (de proef werd onder dezelfde omstandigheden genomen als de vorige):

TABEL XLVIII.

Vloeistof, in de buikholte gebracht:	Glycogeen- gehalte der dubbelproeven, in $\%$ glucose:	Gemiddeld gly- cogeengehalte der leucocyten, in $\%$ glucose:	Hoeveelheid verkregen leucocyten:
NaCl 0.9	0.43.5 $\%$ 0.48 $\%$	0.46 $\%$	0.15 cc.
NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{6}$ + 0.5 $\%$ glucose	1 $\%$ 1.08 $\%$	1.04 $\%$	0.48 cc.

Een derde proef evenwel deed zien, dat ook zonder toevoeging van glucose na de tweede injectie de leucocyten glycogeenrijker zijn dan na de eerste injectie (Tabel IL).

TABEL IL.

Eerst ingebracht 200 cc. NaCl 0.9; 3 uur later uitgeheveld, en weer ingebracht 65 cc. NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{8}$.

Vloeistoffen, achtereenvolgens ingebracht:	Hoeveelheid verkregen leucocyten:	Glycogeengehalte der leucocyten in $\%$ glucose:
NaCl 0.9	0.25 cc.	1.2 $\%$
NaCl 0.9 + serum $\frac{1}{8}$	0.35 cc.	1.4 $\%$

Overal wordt na de 2^e injectie een grooter hoeveelheid leucocyten verkregen dan na de eerste, en deze tweede hoeveelheid bevat overal meer glycogeen.

In de nu volgende proef werden ingespoten twee even oude geiten; de eerste werd beide malen ingespoten met $\pm 1\frac{1}{2}$ L NaCl 0.9 + glucose 0.5 %, de andere eerst alleen met NaCl 0.9 en bij de tweede injectie met NaCl 0.9 + glucose 0.5 %; de vier zoo verkregen suspensies gaven het volgende resultaat (Tabel L). Beide geiten waren ook daags te voren ingespoten met NaCl 0.9 + stijfsel.

TABEL L.

	Vloeistoffen, waarmee achtereenvolgens werd ingespoten:	Hoeveelheid verkregen leucocyten:	Glycogeengehalte der leucocyten in % glucose:
Geit I	NaCl 0.9 + glucose 0.5 %	1.2 cc.	0.69 %
	NaCl 0.9 + glucose 0.5 %	0.9 cc.	0.95 %
Geit II	NaCl 0.9	0.2 cc.	1.12 %
	NaCl 0.9 + 0.5 % glucose	0.43 cc.	1.03 %

Hier zien we dus van een invloed van de glucose op de hoefv. glycogeen niets. Ditmaal is ook de hoefv. leucocyten na de 2^e injectie niet grooter dan na de eerste, klaarblijkelijk, omdat hier reeds een vóórinspuiting had plaats gehad. Dat bij geit II veel minder leucocyten werden verkregen dan bij geit I, wijst niet met zekerheid op een chemotactische werking der glucose, maar is ongetwijfeld mede een gevolg daarvan, dat

bij geit II veel minder vloeistof kon worden terugverkregen door verstopping der buis.

Tabel LI ten slotte doet een proef bij een konijn zien, waar na de tweede injectie (met glucose) de hoeveelheid glycogeen niet noemenswaard was toegenomen.

TABEL LI.

Vloeistoffen, welke achtereenvolgens werden ingespoten:	Hoeveelheid verkregen leucocyten:	Glycogeengehalte der leucocyten in ‰ glucose:
NaCl 0.9	0.15 cc.	1.6 ‰
NaCl 0.9 + glucose 0.5 ‰	0.175 cc.	1.68 ‰

In al deze proeven zijn de resultaten dus zóó wisselend, dat een invloed van glucosetoevoeging op het glycogeengehalte er niet duidelijk uit blijkt; wel schijnt in 't algemeen na de tweede injectie de hoeveelheid glycogeen toe te nemen, onafhankelijk van de toevoeging van glucose; waarschijnlijk staat dit wel daarmee in verband, dat deze leucocyten na de 2^e injectie verkregen, reeds iets langer in de buikholte vertoefden; immers een groot deel er van was, naar we met zekerheid kunnen aannemen, reeds bezig te emigreeren tijdens de 1^e injectie; anders zou de groote hoeveelheid, die na de 2^e injectie verkregen werd, niet zijn te verklaren.

Vervolgens heb ik getracht na te gaan, of het glycogeengehalte der leucocyten ook veranderlijk is, wanneer ze in vitro in verschillende, tot op zekere hoogte physiologische milieu's verblijven.

Ik wil hier direct constateeren, dat het resultaat, dat met deze en analoge proevenreeksen werd verkregen, mij niet bevredigde,

omdat het te wisselend was, en ook om nog na te noemen redenen. Toch wil het me toeschijnen, dat we hier een methode in handen hebben, waarmee bij goed gebruik de invloed van het milieu op een vorm van stofwisseling der cel, welke in het glycogeen gehalte zijn uitdrukking vindt, kan worden gemeten, zooals b.v. de invloed van de aanwezigheid van koolhydraten, van CO_2 , van roode bloedlichaampjes enz.; juist de leucocyten zijn hiervoor zoo geschikt, omdat we hier hebben cellen, die normaal in vrijen toestand leven, en waar het dus mogelijk is, op betrekkelijk eenvoudige wijze toestanden te scheppen, die het physiologische naderen. Om deze redenen alleen ook wil ik mijn eigen voorloopige proeven, ook al bleek hierbij het milieu nog verre van physiologisch, toch vermelden.

Wel moeten de resultaten, welke op deze wijze verkregen werden, met een zeer kritisch oog worden gezien; wanneer b.v. gevonden wordt, dat door het verblijf in een bepaalde vloeistof de hoeveelheid glycogeen toeneemt tegenover het oorspronkelijke gehalte, dan zal dit steeds wijzen op een vorming van glycogeen in de cel; wanneer evenwel de hoeveelheid glycogeen in meerdere of geringere mate vermindert, dan kan dit op zeer verschillende oorzaken berusten: in de eerste plaats kan het voorkomen, dat de cel in volledigen toestand van leven verkeert, en dientengevolge kan worden geacht impermeabel te zijn voor glycogeen; dan zal glycogeenvermindering wijzen op een intracellulaire omzetting er van; maar het milieu kan ook minder physiologisch zijn, en als gevolg daarvan een deel der cellen in meerdere of mindere mate onderhevig zijn aan lysis; hierbij zal de celpermeabiliteit vergrooten en dan zal een vermindering van het glycogeen gehalte kunnen berusten op een oplossing er van in de omgeving.

De verkregen cijfers zullen dus, op zich zelf beschouwd, betrekkelijk weinig waarde hebben, maar hun waarde alleen verkrijgen, wanneer we ze bezien in verband met andere verschijnselen, die we onder den invloed van het milieu aan de cel waarnemen.

De gedachtengang, waarnaar ik mijne proeven richtte, was de volgende: in het litteratuuroverzicht aangaande de glycogeenkwestie is vermeld, dat het onzeker is, of de jodophilie der leucocyten beteekent grootere celactie dan wel celverval; hiervan is het afhankelijk, van welk standpunt we de emigreerende cel moeten beschouwen, en daarom onderzocht ik, of het mogelijk was door proeven uit te maken, wat in dezen met de werkelijkheid overeenkwam. We zouden celactie mogen aannemen, als we glycogeentoeename konden constateeren door toevoeging van glucose aan het milieu, al moet hier direct aan toegevoegd worden, dat een negatief resultaat niet het tegendeel zou bewijzen. Immers deze redeneering plaatst de leucocyten in den zelfden toestand als b.v. de levercellen, waar werkelijk de vorming van glycogeen onder den invloed staat van de hoeveelheid glucose in de omgevende vloeistof. Het is echter waarschijnlijk, dat de levercel, wat zijn permeabiliteitsverhoudingen voor koolhydraten en zijn reactie op de aanwezigheid van koolhydraten betreft, zich heel anders zal gedragen dan b.v. de witte bloedlichaampjes; immers de regeling van het koolhydraatgehalte is een van *de* functies van de levercel, zijn protoplasma moet daarom zoodanig zijn geconstitueerd, dat koolhydraatschommelingen in de omgeving een prikkel vormen, een intracellulaire reactie kunnen tengevolge hebben. De leucocyt, waarvan toch naar alle waarschijnlijkheid de hoofdfunctie in andere richting ligt, zal mogelijk voor dergelijke koolhydraatprikkel veel meer ongevoelig kunnen zijn.

Dat de leucocyt zich anders gedraagt dan de levercel, blijkt wel hieruit, dat men door eenvoudig koken, het glycogeen niet uit de leucocyten kan oplossen, wel uit de tot brij gemaakte lever; laat men verder een leucocytensuspensie staan, dan neemt het gehalte aan glycogeen slechts zeer langzaam af. Duidelijk blijkt ook het geïsoleerd zijn van de leucocyten in dit opzicht uit de volgende proef: een leucocytensuspensie van het konijn (verblijf in de buikholte ongeveer 24 uur) wordt na voldoende uitwasschen in NaCl 0.9 in vier gelijke porties van $\frac{1}{2}$ cc. toegevoegd aan telkens 10 cc. NaCl 0.9, en 10 cc. sublimaat $\frac{1}{5000}$ (beide dubbelproeven), terwijl van twee dergelijke porties direct het glycogeen gehalte wordt bepaald. De eerste vier suspensies worden na eenige minuten inwerken tweemaal door centrifugeeren uitgewasschen ter verwijdering van het sublimaat, en daarna resp. vervangen door:

N^o. 1) Weer NaCl 0.9 ‰ (in plaats van NaCl 0.9).

N^o. 2) NaCl 0.9 bevattende ± 2 ‰ diastase (in plaats van NaCl 0.9).

N^o. 3) NaCl 0.9 (in plaats van sublimaat $\frac{1}{5000}$).

N^o. 4) NaCl 0.9 met 2 ‰ diastase (in plaats van sublimaat $\frac{1}{5000}$).

Door een contrôleproef was gebleken, dat de gebruikte diastaseoplossing zetmeel zoowel als glycogeen met voldoende snelheid splitste.

De suspensies bleven nu ongeveer 3 uur op 30° C. en werden daarna op de gewone wijze op glycogeen onderzocht. Het resultaat is in tabel LII neergelegd.

De eenige conclusie, die hieruit valt op te maken, is, dat de diastase blijkbaar op het glycogeen in de cel absoluut geen invloed heeft gehad; dat dus nòch in de z.n. levende cel in NaCl 0.9, nòch ook in de door sublimaat gefixeerde cel het glycogeen voor diastase aantastbaar was; dat verder de

TABEL LII.

De leucocyten zijn achtereenvolgens behandeld met de volgende vloeistoffen:	Glycogeengehalte der leucocyten in ‰ glucose:
Direct onderzocht	$\left. \begin{array}{l} 1.34 ‰ \\ 1.43 ‰ \end{array} \right\} \text{gemiddeld } 1.38 ‰$
Eerst NaCl 0.9, na uitwasschen weer NaCl 0.9	0.43 ‰
Eerst NaCl 0.9, na uitwasschen NaCl 0.9 met diastase 2 ‰	0.43 ‰
Eerst sublimaat $\frac{1}{5000}$, na uit- wasschen NaCl 0.9	1.07 ‰
Eerst sublimaat $\frac{1}{5000}$, na uit- wasschen NaCl 0.9 met diastase 2 ‰	1.01 ‰

gefixeerde cellen nog veel meer glycogeen hebben behouden dan de niet gefixeerde, en dit dus ook de gefixeerde cel moeilijk verlaat; het grootere verlies in NaCl 0.9 zal een gevolg kunnen zijn of van grootere intracellulaire omzetting, of van grooter verlies naar buiten.

Was op grond van deze proeven dus niet zonder meer aan te nemen, dat het glycogeengehalte in de leucocyten zou reageeren op de glucosetoediening aan de omgeving, de mogelijkheid daarvan bestond toch, al was het na de zoo even besproken proeven in vivo niet waarschijnlijker geworden. Er was evenwel geenerlei invloed te bespeuren, niet bij toevoeging van glucose aan NaCl 0.9 en evenmin, als ik het toevoegde aan serum of serumverduunningen. De tabellen LIII en LIV doen dit duidelijk zien.

TABEL LIII.

Leucocyten suspensie na een verblijf van 24 uur in de buikholte.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:	Gemiddeld glycogeengehalte der leucocyten in $\frac{0}{10}$ glucose:
Directe bepaling	0.52 $\frac{0}{10}$
2 uur in konijneserum op 37° C.	0 $\frac{0}{10}$
2 uur in konijneserum + 0.5 $\frac{0}{10}$ glucose op 37° C.	0 $\frac{0}{10}$

TABEL LIV.

Stijfselinspuiting. Verblijf der leucocyten in de buikholte $\pm$ 6 uur.

Vloeistoffen, die op de leucocyten hebben ingewerkt:	Glycogeengehalte gemiddeld in $\frac{0}{10}$ glucose:
Directe bepaling	<i>a</i> 2.85 $\frac{0}{10}$
	<i>b</i> 2.85 $\frac{0}{10}$
2 uur in NaCl 0.9 op 37° C.	2 $\frac{0}{10}$
2 uur in NaCl 0.9 + 0.5 $\frac{0}{10}$ glucose op 37° C.	2 $\frac{0}{10}$
2 uur in serum op 37° C.	1.43 $\frac{0}{10}$
2 uur in serum + 0.5 $\frac{0}{10}$ glucose op 37° C.	1.43 $\frac{0}{10}$

We zien in beide gevallen in 't minst geen invloed van de glucosetoevoeging; in beide gevallen daalt het glycogeengehalte in serum, veel sneller dan in NaCl 0.9.

Het is me dus niet gelukt, door toediening van een koolhydraat aan het milieu een invloed op het glycogeengehalte aan te toonen. We hebben dus geen nadere aanwijzing, dat de glycogeenvorming is een actief celproces; trouwens, zooals reeds boven werd uiteengezet, evenmin, dat het nu beslist degeneratie moet zijn omdat de leucocyten niet per se sterk behoeven te reageeren op een vermeerdering van glucose in de omgeving.

Om andere redenen leek me evenwel de laatste opvatting meer waarschijnlijk, dat dus, overeenkomstig de vroeger aangehaalde meening van WOLFF, de glycogeenvorming gepaard gaat met beginnende celdegeneratie. Reeds vroeger was ik in de gelegenheid te wijzen op de symptomen, die er op wezen, dat de exsudaatleucocyt betrekkelijk snel zijn ondergang tegemoet gaat en dat terugbrengen in serum deze regressieve verandering tijdelijk tot stilstand kan brengen. Het lag natuurlijk voor de hand, dat ik trachtte een oorzaak voor dit degeneratieve proces te vinden, een factor, die wèl in de buikholte en niet in het bloed aanwezig was; ik kon b.v. denken aan een werking van de onvoldoende hoeveelheid colloïden in het peritoneaalvocht, aan een te hoge CO_2 spanning, aan een gebrek aan zuurstof; verder de mogelijkheid overwegende, dat het vermeerderd glycogeengehalte mogelijkerwijze een maatstaf voor het degeneratieproces zou kunnen zijn, heb ik in deze richting den invloed van verschillende dezer factoren op het glycogeengehalte nagegaan, en heb daartoe van een leucocytensuspensie eerst het glycogeengehalte vastgesteld, en deze daarna laten verblijven in verschillende vloeistoffen: serum, serum rijk aan CO_2 , serum verdund met NaCl 0.9, met en zonder CO_2 , met en zonder

zuurstof. Op geen enkele wijze evenwel vond ik ooit een toename van het glycogeen buiten het lichaam; steeds was het geringer dan direct na het afnemen der suspensie uit de buikholte. Het gelukte me dus niet uit het glycogeen gehalte de oorzaak op te diepen, welke de celdegeneratie bewerkt. Slechts in één proef kreeg ik in vitro vermeerdering, en wel in NaCl 0.9%, waar ik een stijging vond van 0.52% tot 2.6%. Deze stijging valt evenwel weg, tegen de talloze gevallen, dat onder invloed van NaCl 0.9 het glycogeen gehalte daalde.

Wel kreeg ik duidelijke aanwijzingen, dat de vermindering in het glycogeen gehalte, die we ook bijna zonder uitzondering in serum zien optreden, daar op een andere oorzaak berust, dan wanneer we ze in andere vloeistoffen, b.v. NaCl 0.9 of serum, verdund met NaCl 0.9, aantreffen.

Zonder uitzondering kon ik n.l. constateeren, dat, wanneer de leucocyten eenige uren op 37° C. hadden gestaan in de verschillende vloeistoffen, alleen in het bloedserum bij het latere centrifugeeren en ook bij het uitwasschen de bovenstaande vloeistof helder was: in de andere media was zij steeds sterk opaliseerend, en bleef dit tijdens het herhaald uitwasschen; dit is een niet weg te cijferen aanwijzing, dat in al deze media de cel na korten tijd door lysis vele stoffen verliest, niet daarentegen in serum; ten overvloede voeg ik hieraan toe, dat de opalescentie niet berust op de aanwezigheid van glycogeen.

Ik kan dit het best toelichten aan de hand van de volgende proef, waarvan de resultaten in tabel LV zijn neergelegd.

Niettegenstaande de onbevredigende overeenkomst tusschen de beide dubbelproeven, blijkt toch in alle vloeistoffen het glycogeen gehalte sterk te zijn verminderd. Waar echter na het uitwasschen alleen in serum de vloeistof helder blijft, en in al de andere vloeistoffen sterk opaliseert, kunnen we op goede

TABEL LV.

Een leucoctensuspensie wordt na een verblijf van ± 24 uur in de buikholte en na centrifugeeren, in 8 gelijke porties van 0.65 cc., elk bevattende 0.225 cc. leucocyten, blootgesteld aan de inwerking van de vloeistoffen, in de tabel genoemd, welke 3 uur bij 30° C. inwerken.

Vloeistoffen, die op de leucocyten 3 uur bij 30° C. hebben ingewerkt:		Glycogeengehalte der leucocyten in $\%$ glucose:
Direct onderzocht	<i>a</i>	} gem. 2.28 $\%$
	<i>b</i>	
NaCl 0.9 $\%$		0.8 $\%$
Serum (iets verlies)		0.6 $\%$
Serum + CO ₂ (iets verlies)		0.8 $\%$
1 Serum + 7 NaCl 0.9		0.8 $\%$
1 Serum + 7 NaCl 0.9 + CO ₂		1.33 $\%$
1 Serum + 7 NaCl 0.9 + CO ₂ + 0.3 $\%$ glucose		1.27 $\%$

gronden de glycogeenvermindering in serum toeschrijven aan de celstofwisseling, en in NaCl 0.9 en de andere vloeistoffen ten minste voor een deel aan een lytisch celproces; dat werkelijk in serum de cel „levend” is na een verblijf van 3 uur, bleek duidelijk hieruit, dat alleen in de beide sera microscopisch de leucocyten zeer sterke pseudopodien vertoonden. Opvallend is nog, dat onder invloed van het CO₂ in het verdunde serum de afname in het glycogeengehalte veel geringer is. Waarschijnlijk berust dit op een beginnende fixatiewerking van de zuurdere vloeistof; de cel is hier minder aan lysis onderhevig; we vinden

hier b.v. onder invloed van de lichaamstemperatuur geen spoor van agglutinatie der cellen, welke in serum en ook in het verdunde serum zonder CO_2 zeer sterk was uitgesproken. De CO_2 -werking zou dan, zij het ook zwakker, overeenkomen met den invloed van sublimaatfixatie; het onverdunde serum vertoont deze werking van CO_2 -toevoeging niet, klaarblijkelijk, doordat hierin, als zijnde een veel volmaakter buffersysteem, koolzuur-doorleiding het aantal H-ionen slechts weinig doet toenemen.

Terwijl in deze proef de vermindering in het glycogeen-gehalte in serum het sterkst is uitgesproken, was dit niet altijd het geval; hiervan levert tabel LVI het bewijs:

TABEL LVI.

Vloeistoffen, die achtereenvolgens op de leucocyten hebben ingewerkt:	Glycogeengehalte der leucocyten in 0% glucose:
Serum, 2 uur op 37° C., daarna 18 uur op 0° C.	1.33 0/0
Serum, 20 uur op 0° C.	1.28 0/0
Serum $\frac{1}{6}$ + CO_2 , 20 uur op 0° C.	0.99 0/0
NaCl 0.9, 20 uur op 0° C.	0.78 0/0
Direct onderzoek	2 0/0

Hier speelt evenwel waarschijnlijk de veel sterkere lysis der cel door het langere verblijf in NaCl 0.9 mede een rol. De proef heeft n.l. betrekking op dezelfde leucocyten, als die, welke in de proef van tabel XXXVIII zijn onderzocht.

Als een verder voorbeeld, dat onder den invloed van lytisch te gronde gaan van cellen het glycogeengehalte afneemt, haal

ik hier een paar proeven aan, verricht aan oudere exsudaatcellen, n.l. afkomstig van pus van menselijke abscessen. Deze pus was zeer rijk aan leucocyten en werd eerst herhaalde malen met NaCl 0.9 uitgewasschen, daarna het leucocytenvolume bepaald enz. De waschvloeistof vertoonde steeds dezelfde sterke opalescentie als in de boven beschreven proeven. Deze etter nu, het prototype, waarbij het eerst het glycogeegehalte van leucocyten chemisch werd vastgesteld, bevatte veel minder glycogeen, dan mijne verse exsudaatleucocyten van het konijn, zooals blijkt uit de volgende cijfers:

Menschelijke pus (minstens 5 dagen oud). Glycogeegehalte:

a) 0.31 % b) 0.25 % gemiddeld 0.28 %.

Submaxillair absces mensch: Glycogeegehalte 0.54 %.

d) *Glycogeegehalte van bloedleucocyten.*

Tot nog toe heb ik als 't ware stilzwijgend aangenomen, dat de jodophilie met het glycogeegehalte nauw verband houdt, hoewel in de inleiding tot dit hoofdstuk is gebleken, dat de al of niet bruinkleuring door jodium geen maatstaf is voor de hoeveelheid glycogeen. In deze inleiding bleek ook, dat de kwestie, of de witte bloedlichaampjes ook in de bloedbaan glycogeen bevatten, in het minst niet is uitgemaakt. Hiervan is alleen de jodophilie onderzocht; over de chemische analyse bestaan alleen onderzoeken over het bloed in zijn geheel, en de conclusies, die men hieruit heeft getrokken over de localisatie van de gevonden hoeveelheden, berusten geheel op speculatie.

De uitzonderingstoestand, welke bij het paardebloed zich voordoet, maakt, dat dit eigenlijk de eenige van alle bloedsoorten is, die zich leent tot het onderzoek op glycogeen van

de witte bloedlichaampjes afzonderlijk; door middel van het opvangen in Na-citraat kunnen we hier de witte bloedlichaampjes vrij wel zuiver verkrijgen. De roode bloedlichaampjes, ook al zijn ze nog even talrijk als de witte aanwezig, zullen door hun kleiner volume het resultaat slechts weinig beïnvloeden, omdat zooals wel bekend is, het gehalte aan glycogeen hierin minimaal is. Ook bij de bepaling van het glycogeengehalte aan exsudaatleucocyten moest ik een enkele maal van het gemeten volume dat van de roode bloedlichaampjes aftrekken; door de verhouding van het aantal roode en witte bloedlichaampjes in de suspensie te tellen, laat zich dit gemakkelijk vrij nauwkeurig schatten.

Het is jammer, dat ik voor het onderzoek van bloedleucocyten op glycogeen niet konijnbloed kon gebruiken; immers dan zou het me mogelijk zijn geweest exsudaatleucocyten en bloedleucocyten direct te vergelijken, wat betreft hun glycogeengehalte; de tijdsomstandigheden lieten verder niet toe, paarden als object voor exsudaatleucocyten te bezigen. De cijfers, waarover ik beschik, zijn dus niet direct te gebruiken als vergelijkingsobject tusschen beide soorten bloedlichaampjes

Toch is het resultaat in verband met den jodophilie merkwaardig genoeg; het *glycogeengehalte, dat ik voor paardebloedlichaampjes vond, bleek n.l. vrijwel even hoog te zijn, als dat der exsudaatleucocyten van het konijn.*

Dit blijkt uit enkele cijfers, die ik bij verschillende paarden vond voor het glycogeengehalte; de meeste als dubbelproeven.

I. 0.64 ‰.	II. a) 1.32 ‰. b) 1.28 ‰.	III. a) 1.26 ‰. b) 1.23 ‰.	IV. a) 1.5 ‰. b) 1.55 ‰.

Vergelijken we met dit hoge glycogeengehalte de sterkte van de microscopische Jodiumreactie, dan blijkt, dat van de bloedlichaampjes alleen de korreling der eosinophile cellen

noemenswaard bruin wordt gekleurd. *We zien dus een groot glycogeengehalte bij nagenoeg afwezige J.-reactie*, wat overeenkomt met het door MAX BLEIBTREU en KAN KATO vermelde (zie pag. 140).

Nu zou men kunnen denken, dat het hier gevondene een uitzondering is, die alleen op het paard betrekking heeft, zooals het paard zich immers ook in andere organen door een hoog glycogeengehalte onderscheidt. Dat dit evenwel niet opgaat, blijkt uit het feit, dat ook varkensleucocyten, die, zooals vroeger opgemerkt is, zich soms evenals de bloedlichaampjes van het paard laten afscheiden, ditzelfde hoge glycogeengehalte bleken te bevatten. De suspensie waarop ook tabel XXXI betrekking heeft, en die zich op 37° zeer snel uit varkensbloed met citraat afscheidde, bevatte bij eerste onderzoek 0.84 en 0.96, gemidd. 0.9 %, en nadat de suspensie 18 uur in citraatplasma had gestaan, bij tweede onderzoek zelfs 1.13 en 1.27, gemiddeld 1.2 %. Wanneer we van deze beide het gemiddelde nemen, blijkt ook hier het glycogeengehalte meer dan 1 % te bedragen.

Uit al deze cijfers blijkt in elk geval genoegzaam, zooals ook te verwachten was, dat we niet kunnen zeggen, dat in de witte bloedlichaampjes in de bloedbaan het glycogeen zóó oplosbaar is, dat het zeer snel verdwijnt uit de cellen. De door mij onderzochte leucocyten hadden buiten het lichaam minstens 2 uur in Na-citraat gestaan, en hadden dus alle gelegenheid om hun glycogeen te verliezen.

Nu kan men mij natuurlijk tegenwerpen, dat het door mij gevonden hoge glycogeengehalte niet overeenkomt met de werkelijke toestand in het bloed, maar eerst naderhand ontstaan is als gevolg en onder invloed van de aanwezigheid van Na-citraat. Hiertoe bestaat werkelijk alle gelegenheid, omdat ik,

alvorens het glycogeen-onderzoek te kunnen verrichten, het bloed steeds minstens een uur aan zich zelf moest overlaten om de suspensie tot afscheiding te brengen.

Om deze mogelijkheid te kunnen beoordeelen, heb ik nagegaan, of mogelijkwijze het glycogeengehalte der paardeleucocyten weer terugging, als ik ze terugbracht in bloedserum van het paard, en daarin $2\frac{1}{2}$ uur op 37° C. liet staan. *Op die wijze daalde in één proef het glycogeengehalte werkelijk van 1.5 % in de citraatsuspensie tot 0.2 % na behandeling met serum.* Dit is dus een analoge invloed, als die, welke serumbehandeling meestal had op het glycogeengehalte van de exsudaat-leucocyten van het konijn. Deze werking van het serum is echter ook hier niet constant: bij een volgende proef verhoogde veeleer het glycogeengehalte onder invloed van de serumbehandeling. Bij deze proef onderzocht ik ten eerste het glycogeengehalte direct in de citraatsuspensie, daarnaast in dezelfde citraatsuspensie, nadat deze 24 uur op 0° had gestaan, en ten slotte in eenzelfde hoeveelheid leucocyten, die eerst 2 uur in serum, deels op 37° , deels op kamertemperatuur hadden gestaan. (Tabel LVII).

TABEL LVII.

De leucocyten verblijven in de volgende vloeistoffen:	Glycogeengehalte in % glucose:
Citraatplasma, direct onderzoek	1 %
Citraatplasma, 24 uur	1 %
Serum 2 uur op 20° C.	1.25 %
Serum 2 uur 37° C.	1.42 %

De behandeling met serum geeft dus geen aanknooppingspunt voor de beantwoording van de vraag, of misschien onder invloed van het citraat het glycogeen in de cel ontstaat. Overigens is deze laatste werking niet waarschijnlijk. Wanneer ik de bovenstaande proef bezie, en ook talrijke andere gevallen beschouw, waarin ik het glycogeengehalte in citraathoudend milieu onderzocht, kom ik veeleer tot de onderstelling, dat *onder inwerking van het Na-citraat het glycogeengehalte van de cel eenigermate onveranderd wordt vastgelegd*.

Deze opmerking maakte ik ook bij het onderzoek van konijn-bloedlichaampjes. Citras natricus werkt dan in zekeren zin conserveerend op de cel, en de werking is eenigermate te vergelijken met die, door CO₂ uitgeoefend. Het remt ook de amoeboïde bewegelijkheid, waarschijnlijk stofwisselingsprocessen en ook het lytisch te gronde gaan der cellen. Zoodanig opgevat, zou dus het citras natricus het glycogeengehalte van het bloed vastleggen, en zou onze bepaling juist een goed beeld geven van den oogenblikkelijken toestand van het glycogeen in de bloedleucocyten.

Onder den invloed van serum schijnt het glycogeengehalte snel te kunnen afnemen, en ook op dezelfde hoogte te kunnen blijven, ja zelfs te kunnen toenemen; welke factoren hier deze wisselende werking beheerschen, is nog niet uit te maken.

Ik heb nog getracht de oplossing van het vraagstuk nader te komen door een hoeveelheid paardebloed zelf op glycogeen te onderzoeken; ik kon door berekening aannemen, dat in 100 cc. bloed misschien 0.5 cc. leucocyten zich zouden bevinden, een hoeveelheid, waarvan het gehalte aan glycogeen meetbaar zou zijn. Daarom ving ik 100 cc. bloed op in evenveel 60 % kaliloog direct uit de v. jugularis van het paard en verwerkte het onmiddellijk op glycogeen; het bleek evenwel,

dat met bloed dit procédé zeer tijdroovend is; bij het uitwaschen met alcohol hield ik een grijsbruin volumineus neerslag, dat niet uit glycogeen bestond; na drogen er van en behandeling met gedestilleerd water bleef practisch alles onopgelost; de oplossing die nog verkregen werd, was niet opaliseerend, gaf geen glycogeenreactie met Jodium, en geen noemenswaarde reductie na zoutzuurhydrolyse.

Voorloopig was dus het resultaat negatief, maar, daar de methodiek onbevredigend was, zonder werkelijke waarde.

Reeds in de inleiding tot dit hoofdstuk is medegedeeld, dat andere onderzoekers wisselende resultaten verkregen. Het meerendeel vond in het bloed geen glycogeen; ook waar anderen, b.v. SALOMON, positief resultaat kregen, bleef het gehalte toch tot sporen beperkt. Daarentegen geven LÉPINE en BARRAL ¹⁾ aan in hondenbloed 30 cgr. glycogeen per Liter bloed te hebben gevonden.

Reeds vroeger vermeldde ik, dat KAUFMANN ²⁾ het glycogeen vond als een constant bloedbestanddeel in hoeveelheden van 10—25 mgr. per Liter bij mensch, paard, rund en hond, terwijl bij diabetische dieren de hoeveelheid sterk vermeerderde. KAUFMANN onderstelt, dat dit glycogeen alles uit de lever afkomstig is.

CZERNY ³⁾ vond volgens een nieuwe, door HUPPERT ⁴⁾ uitgewerkte methode in het bloed van honden per Liter 1.56 mgr. gemiddeld, en in bloed met jodophile leucocyten 3.36 mgr.

¹⁾ C. R. 112. 1415, 1891.

²⁾ l. c.

³⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1892, 31 p. 190.

⁴⁾ Zentr. Bl. f. Physiologie 1892, VI., p. 394. Een nadere beschrijving der methode, aangekondigd in Zeitschr. f. Physiol. Chem., heb ik daar niet kunnen vinden.

glycogeen. In 100 cc. van uiteenlopende ettermassa's vond hij hoeveelheden, wisselende tusschen 21.9 en 230.4 mgr. glycogeen, dus veel geringer, dan ik in mijne exsudaatleucocyten, of zelfs in menschelijke pus vond. Vrij zeker zullen deze lage cijfers mede een gevolg zijn van de gevolgde methode van glycogeenbepaling; in 't algemeen werd hiervoor, voor zoover me mogelijk was het na te gaan, de min of meer gewijzigde methode van BRÜCKE gebruikt. Nu is het bekend, dat hiermee lager waarden verkregen worden, dan met de methode van PFLÜGER, maar ook op grond van wat ik op. pag. 156 heb medegedeeld, kan men niet verwachten, dat door eenvoudig koken, zooals bij de methode van BRÜCKE geschiedt, het glycogeen ook maar eenigszins voldoende aan de leucocyten wordt onttrokken.

Het wil me dus toeschijnen, dat de vraag, of in bloed glycogeen in noemenswaarde hoeveelheid voorkomt, nog niet is opgelost. In elk geval blijkt uit mijn onderzoek, dat witte bloedlichaampjes, uit het bloed van het paard en het varken afkomstig, aanmerkelijke hoeveelheden glycogeen kunnen bevatten; als we het glycogeen in het bloed, wat de meeste onderzoekers doen, nagenoeg geheel in de witte bloedlichaampjes gelocaliseerd denken, zou voor paardebloed en varkensbloed, dat per liter bloed, zeker 3—5 cc. leucocyten bevat, het glycogeengehalte per liter bloed ongeveer 40 mgr. bedragen, dus veel hoger dan het bedrag, dat CZERNY vond voor hondenbloed.

S a m e n v a t t i n g.

Samenvattend, blijkt dus, dat de resultaten van mijne quantitative bepalingen, ook al door de nog onvoldoende methodiek, mij nog geen recht geven tot scherp omschreven conclusies over de verhouding van het glycogeen tot de elementen van het bloed. Het gelukte me voorloopig niet de factoren op te

sporen, welke de glycogeenvorming beheerschen, en ik had nog geen gelegenheid, mijne proeven in deze richting voort te zetten. Gelijk ik vroeger reeds aangaf, lijkt me evenwel de methode, bij zorgvuldige toepassing, bij uitstek geschikt, om de wisselingen in het glycogeengehalte van de leucocyten onder verschillende omstandigheden na te gaan, en hierdoor ten minste eenigermate een inzicht te krijgen in één der stofwisselingsprocessen van deze cellen.

Voorloopig kon ik reeds vaststellen, dat bloedserum zeer zeker, hoewel niet altijd kwalitatief en quantitatief gelijk, het glycogeengehalte beïnvloedt; dat in verschillende milieu's (ultrafiltraat, NaCl 0.9, verdund serum) buiten het lichaam door cytolyse het glycogeengehalte vermindert; dat verschillende invloeden (verhoogde zuurgraad, Na-citraat), welke deze cytolyse tegengaan, ook de vermindering van het glycogeengehalte min of meer tegenhouden. Verder, dat afgezien van de cytolyse, het glycogeen zeer moeilijk aan de cellen wordt onttrokken, zowel in levenden als in gefixeerden toestand.

Ten slotte lijkt het meer dan waarschijnlijk, dat het glycogeen in de leucocyten niet onder den invloed van het emigreeren gevormd wordt; immers ook in het bloed was het duidelijk aanwezig. Daar er echter met de microscopische Jodiumreactie een duidelijk verschil aan het licht komt tusschen geëmigreerde en bloedleucocyten, ben ik geneigd aan te nemen, dat in het bloed het glycogeen zoodanig is vastgelegd, dat het niet de Jodiumreactie geeft, dat het dus als 't ware daar „latent" is, en na de emigratie meer vrij of manifest wordt. Immers er is voorloopig geen reden, om er aan te twijfelen, dat de jodophilie der leucocyten werkelijk op de aanwezigheid van glycogeen berust. Waar, zooals we verder zullen zien, Jodium evenwel ook anderszins in de cel wordt vastgelegd, is het gewenscht, de

jodiumreactie hier nooit te gebruiken als maatstaf voor het glycogeengehalte.

Het verband tusschen glycogeenvermeerdering (of liever het manifest worden er van door middel van de Jodiumreactie) en celdegeneratie is voorloopig niet uitgemaakt. Wel schijnt het glycogeenproces zich in de cel af te spelen, niet beïnvloed door het koolhydraatgehalte in de omgevende vloeistof.

2. ANDERE STOFWISSELINGSPROCESSEN EN FERMENTWERKINGEN IN DE LEUCOCYTEN; HUN REDUCEEREND VERMOGEN.

Het wisselende glycogeengehalte is slechts één der uitingen van de veranderingen, die zich in het inwendige der witte bloedlichaampjes afspelen.

Met reden heeft men in de reeds vroeger genoemde oxydasen en reductiewerkingen, aan de proteolytische fermenten, aan de carbohydrasen een zeer groote beteekenis toegekend voor de rol, welke het witte bloedlichaampje speelt; in de eerste plaats zijn al deze fermenten gevonden bij de polynucleaire leucocyten.

Tot op heden heb ik me slechts met een enkele dezer werkingen, en dan slechts zeer terloops kunnen bezig houden, en wederom, om mijne onderstelling te toetsen, dat ook deze processen in de witte bloedlichaampjes zich zullen wijzigen onder den invloed van het omgevende milieu. Men heeft tot nu toe volstaan, hetzij microscopisch (oxydasereactie) of aan leucocytenextracten deze werkingen vast te stellen.

Het was nagenoeg uitsluitend de reduceerende werking, welke men in de leucocyten kan aantreffen, welke mij eenigermate heeft beziggehouden. Wel is waar is het fermentkarakter van deze processen niet zeker vastgesteld, en voor een deel zijn ze zeker niet afhankelijk van fermenten, maar ik vond, dat

dezelfde leucocyt zich te dezen opzichte in verschillende media verschillend kan gedragen. In de eerste plaats bleek dit uit een verschillenden invloed op LUGOL's oplossing, welke ik toevoegde, om de amylumphagocytose te constateeren. Jodium is n.l. een stof, die in oplossing gemakkelijk door verschillende organische stoffen wordt aangetast; vaak zal dit zijn een reductieproces, n.l. vorming van HJ bij aanwezigheid van water en vrij worden van zuurstof, of wel het Jodium wordt door de organische stof direct geaddeerd. Deze processen bewerken natuurlijk het verdwijnen van de bruinkleuring door Jodium. Een dergelijke reduceerende werking heeft b.v. zeer sterk het ultrafiltraat, dat in staat is een betrekkelijk groote hoeveelheid J. te ontkleuren.

Het gevolg van deze werking is, dat, als men aan een leucocyten suspensie in ultrafiltraat Jodiumoplossing toevoegt, ook de leucocyten ongekleurd blijven, evenals het amyllum dat de leucocyten hebben opgenomen; toch laat de wand der leucocyten het Jodium oogenblikkelijk door. In $NaCl$ 0.9 en b.v. in Ca -houdende oplossingen worden daarom bij één druppel Lugol de cellen direct geel getint, het er in vervatte amyllum blauwzwart; in ultrafiltraat bereikt men door een veel grootere dosis J. nog slechts een lichte blauwkleuring van het amyllum in de cel. Hier wordt dus verreweg het grootste gedeelte van het J. op de een of andere manier vastgelegd. In de eerste plaats gebeurt dit natuurlijk door stoffen in het ultrafiltraat zelf, maar toch zijn er heel duidelijke aanwijzingen, dat ook de witte bloedlichaampjes zelf hierbij zeer actief zijn; immers als door een groote dosis J. ten slotte het amyllum in de leucocyten gekleurd is, blijft toch de leucocyt zelf geheel ontkleurd, wat niet anders verklaard kan worden dan door een reductiewerking in den leucocyt; verder wordt, als het J. de amyllumkorrels heeft

gekleurd, korten tijd later alles weer ongekleurd. Nog beter bewijzend was ten slotte voor deze celwerking het volgende: wanneer ik slechts voldoende Jodium toevoegde, bleef het ultrafiltraat ten slotte (een tijdlang) geel gekleurd; als na eenigen tijd hierin de witte bloedlichaampjes naar den bodem waren gezonken, zag ik juist boven dit leucocytsediment de vloeistof wederom ontkleuren. In NaCl 0.9 ontbreekt dus deze reduceerende werking der cel totaal; in ultrafiltraat is zij buitengewoon sterk voorhanden. In tegenstelling met b.v. de amoëboïde bewegelijkheid wordt deze eigenschap der leucocyten door alkalische reactie bevorderd: immers in het niet behandelde ultrafiltraat is zij duidelijk sterker dan na CO₂-doorvoering.

Een analoge werking was ook zichtbaar in serum en tot op zekere hoogte ook in serumverduunningen, maar hierin spelen ongetwijfeld ook de colloïden van het serum een rol bij de J.-binding.

Van de serumvrije vloeistoffen vond ik ook een reduceerende werking der leucocyten in wat geringer graad in de reeds vroeger besproken gewijzigde vloeistof van RINGER; deze vloeistof zelf ontkleurt J. niet of niet noemenswaard; wanneer evenwel leucocyten worden toegevoegd, is de kleur van de vloeistof bij éénzelfde hoeveelheid J. duidelijk lichter dan b.v. in NaCl 0.9, of b.v. in een mengsel NaCl 0.9—CaCl₂; ook de leucocyten zijn hierin bijna geheel ontkleurd.

De reduceerende werking in het ultrafiltraat uit zich ook zeer duidelijk door een bruine verkleuring na toevoeging van een druppel osmiumzuuroplossing.

Nu is Jodium, evenals osmiumzuur, een fixatiemiddel voor de cel, en zal dus zeker den toestand van de cel zelf veranderen. Het was dus gewenscht, na te gaan, of ook voor andere stoffen een dergelijke ontkleurende werking viel op te merken, welke tevens zeer weinig schadelijk zijn voor de cel. Ik moest hiervoor

kiezen onder de z.n. „vitale kleurstoffen”; voor mijn doel leende zich het best het *methyleenblauw*, het klassieke middel, waarmee EHRLICH de oxydeerend-reduceerende werking van cellen en organen aantoonde. Toen ik nu verse exsudaat-leucocyten van het konijn in gelijke hoeveelheid bracht in NaCl 0.9 en in ultrafiltraat (rond) onder toevoeging van een overal gelijke hoeveelheid methyleenblauwoplossing bleek me het volgende: in NaCl 0.9 is de vloeistof gelijkmatig blauw, en op den bodem bevindt zich een leucocytsediment, dat eveneens gelijkmatig donkerblauw is gekleurd; in ultrafiltraat daarentegen is het geheele bovenste deel van de vloeistof blauw, alleen onmiddellijk boven het leucocytsediment is een geheel ontkleurd laagje, terwijl dit sediment zelf, dat toch ongetwijfeld het methyleenblauw sterk heeft geadsorbeerd, geheel ontkleurd is.

Eenzelfde ontkleuring van het methyleenblauw in het sediment was ook zichtbaar in serum zelf en in het uit de leucocyten suspensie verkregen buikplasma.

We zien dus, dat de verwerking van het opgenomen methyleenblauw door de cellen afhankelijk is van het medium; immers in beide gevallen verdienen de leucocyten zeer zeker den naam „levend” nog.

Een beïnvloeding van een (ferment)proces door het omgevende milieu is een zeer gewoon verschijnsel; hierop moet toch de wisselende functie en reactie van ons lichaam bij geringe wijzigingen van de omspoelende vloeistoffen berusten, schommelingen in het physiologische milieu, welke de reactiesnelheid kunnen beïnvloeden, ja het proces zelfs kunnen omkeeren. Het bovenstaande lijkt me een duidelijke illustratie van de wijze, waarop ook een dergelijk proces, tot stand komend in de schijnbaar nagenoeg geheel geïsoleerde cel, ook daar nog

duidelijk de terugwerking ondervindt van de omgeving, en bewijst de wenschelijkheid, om bij het aangeven van alle fermentwerkingen nauwkeurig den toestand van het milieu aan te geven.

Over de verdere fermentwerkingen der leucocyten bezit ik nagenoeg geen eigen ervaringen. Alleen heb ik geprobeerd de *amylolytische werking* van de levende leucocyten te bepalen. Het was me n.l. opgevallen, dat reeds een paar uur na het inbrengen van een stijfseloplossing in de buikholte van het konijn, de uitgehevelde suspensie geen amyllum meer bevatte; amyllum wordt dus in de buikholte snel omgezet, en ik trachtte na te gaan, in hoeverre de geëmigreerde leucocyten hierbij een rol konden spelen. Daartoe voegde ik een zekere hoeveelheid van een stijfseloplossing tõe aan leucocyten-suspensies in verschillend milieu, en daarnaast aan dezelfde vloeistoffen zonder leucocyten; hierbij bleek, dat b.v. in de exsudaatvloeistof en ook in serum, de amyllumreactie snel verdwijnt, zonder dat men hier van een versnelling door de leucocyten kan spreken. In NaCl 0.9 en ultrafiltraat vermindert, ook bij aanwezigheid van leucocyten, daarentegen de amyllumreactie niet in het minst. Een invloed van de levende cel op de stijfselvertering in de omgeving kon ik dus vooralsnog niet aantoonen.

HOOFDSTUK IV.

DE LEVENSDUUR DER WITTE BLOEDLICHAAMPJES IN VERSCHILLEND MILIEU.

Over den levensduur van de witte bloedlichaampjes in het lichaam bezitten we slechts zeer onvoldoende gegevens, evenals trouwens over den tijd, welke de meeste celsoorten kunnen leven vanaf het oogenblik, dat zij zich niet meer deelen.

De witte bloedlichaampjes worden over het algemeen opgevat als cellen, die onderhevig zijn aan snel te gronde gaan; wel bekend is, dat bij de processen, waarbij ze vooral hun werkzaamheid ontplooien, een groot deel der cellen vernietigd wordt. Als bewijs, hoe weinig weerstandsvermogen men deze cellen toekent, moge dienen, dat, zooals algemeen wordt aangenomen, bij het stollingsproces, en vooral bij het defibrineeren, een zeer groot aantal afsterft.

Uit deze teerheid van de cel volgt evenwel nog niet, dat de levensduur in het lichaam ook kort is, als ze onder normale omstandigheden, dus goed beschermd tegen schadelijke factoren, verkeerden. Zenuwcellen zijn ook teer, en toch wordt juist aan deze cellen een buitengewoon lange levensduur toegekend.

Alvorens in het laatste hoofdstuk op deze levensloop der witte bloedlichaampjes wat dieper in te gaan, wil ik hier enkele opmerkingen mededeelen over den tijd, gedurende welken volgens mijne ervaring en die van anderen het witte

bloedlichaampje buiten het lichaam in leven kan blijven. Men zou zich kunnen voorstellen, dat die tijd in zekeren zin onbepikt zal wezen, omdat we hier te doen hebben met cellen, die een groote overeenkomst hebben met vrij levende cellen, en die dus in hun levensmogelijkheid niet afhankelijk behoeven te zijn van bepaalde factoren, zooals zenuwwerking en bloedvoorziening, waarvan de ingewikkelde samenwerking de functie van de meeste organen beheerscht. Hier is een cel, die schijnbaar vrij leeft in zijn milieu, en waarvoor het dus betrekkelijk eenvoudig moet schijnen, om ook buiten het lichaam zoodanige omstandigheden te scheppen, dat de levensmogelijkheid van de cel alleen begrensd is op dezelfde wijze, als dit ook in het lichaam het geval is. Bij een ideaal cultiveeren in vitro, waarbij de cellen hun normale stofwisseling behouden, zouden we direct ook in staat zijn een oordeel te hebben over de levensduur van de cellen in het lichaam; immers deze laatste kunnen we daarom niet bepalen, omdat we over de hoegrootheid van de voortdurende aanmaak en het voortdurend verval niet kunnen oordeelen, welke moeilijkheid de cultuur in vitro niet zou opleveren.

Een dergelijke cultuur vereischt evenwel een absoluut uitsluiten van bacteriewerking, omdat waar op lichaamstemperatuur gewerkt moet worden, een slechts geringe bacterieontwikkeling direct de leucocyten doet afsterven. Om dit te bereiken, en toch het milieu ook bij voortduring physiologisch te houden, zijn evenwel uitgebreide voorzorgsmaatregelen noodig.

Mijn reeds vroeger in het hoofdstuk over phagocytose aangehaalde proevenreeks (zie pag. 79 e.v.) is als een begin in deze richting te beschouwen: hierbij ging ik na den invloed, welke een kortdurend verblijf van leucocyten op 37° C. in verschillende vloeistoffen op het leven der leucocyten had; de

proef duurde zóó kort, dat van een belemmerende bacteriewerking nog geen sprake kon zijn.

In de vroeger aangehaalde proeven werden in dit opzicht in hoofdzaak alleen NaCl 0.9 naast serum en serum, verdund met NaCl 0.9, nagegaan. De vitaliteit der leucocyten werd gemeten aan de mate, waarin ze in geschikte omgeving (serum $\frac{1}{6}$) in staat waren, amylum op te nemen.

In tabel LVIII vermeld ik een proef, waarbij de rij der onderzochte vloeistoffen nog werd uitgebreid.

TABEL LVIII.

Leucocytensuspensie na een verblijf van 18 uur in de buikholte. Van de na uitwasschen verkregen suspensie wordt een klein gedeelte direct op phagocytose onderzocht, en de rest in porties van 1 cc. toegevoegd aan de vloeistoffen van de tabel. Het vermogen tot phagocytose werd onderzocht in serum $\frac{1}{6}$.

De leucocyten werden bewaard in de volgende vloeistoffen (2 uur op 37° C., daarna 18 uur op 0° C.):	Procentgetal der leucocyten, welke na een verblijf van $\frac{1}{2}$ uur in serum $\frac{1}{6}$ amylum opnamen:
Serum konijn	153 223 = 68.6 %
1 serum konijn + 5 ultrafiltraat rund (neutraal)	64 251 = 25.5 %
1 serum konijn + 5 ultrafiltraat konijn (alkalisch)	36 168 = 21.4 %
1 serum konijn + 5 NaCl 0.9	23 230 = 10 %
Suspensievloeistof uit buikholte	86 258 = 33.3 %
Ultrafiltraat (neutraal)	7 220 = 3.1 %
Direct onderzocht	228 352 = 64.7 %

Hieruit blijkt wederom ten duidelijkste, dat wanneer de leucocyten op lichaamstemperatuur korten tijd verblijven in verschillende vloeistoffen, hunne levenseigenschappen, uitgedrukt in procenten phagocytose, alleen in onverdund bloedserum intact blijven. Zelfs een verdunning van de serumcolloïden met ultrafiltraat is niet afdoende, evenmin de vloeistof, waarin de leucocyten in de buikholte waren gesuspenderd.

Waar deze proeven er op wezen, dat alleen het bloedserum zelf als het beste milieu is te beschouwen om witte bloedlichaampjes buiten het lichaam intact te bewaren, heb ik nu verder nagegaan, hoe lang witte bloedlichaampjes van warmbloedige dieren in verschillende media kunnen worden geconserveerd, maar nu bij een temperatuur van 0° C., waarbij de stofwisseling der cel en ook de remmende bacteriewerking nagenoeg tot nul zijn gereduceerd. Door deze daling van de normale en abnormale stofwisseling zal zoowel de gewone werking van het serum als ook de eventuele nadeelige werking van de andere milieu's gemitigeerd tot uitdrukking komen; deze proeven zijn dan ook *sensu strictiori* geen proeven over den levensduur der witte bloedlichaampjes, het is geen cultuur er van, alleen een conserveeren.

Over den levensduur van de witte bloedlichaampjes, op deze wijze bestudeerd, beschikken we reeds over gegevens van eenige onderzoekers. Vaak betroffen het opmerkingen, ter loops gedaan naar aanleiding van andere onderzoeken; meestal hadden de onderzoeken betrekking op koudbloedigen, waar men, ook als men bij lagere temperatuur werkte, nog eenigermate van een cultuur *in vitro* kon spreken. Als levenskenmerk nam men meestal de amoëboïde bewegelijkheid, verder ook wel de phagocytose.

Zoo zag ARNOLD ¹⁾ nog na 4—5 dagen levensverschijnselen aan leucocyten, die hij in vliermerg had laten emigreeren; ZAHN ²⁾ vond nog na twee maanden bewegingen aan leucocyten, die hij in gesteriliseerde buizen had opgevangen in steriele lymfe. ALFRED BLUMENTHAL ³⁾ maakte zoowel cultures in vivo als in vitro; in vivo plaatste hij leucocyten in collodionzakjes in de buikholte van caviae. In vitro bewaarde hij in een steriel gehouden apparaatje kikker-leucocyten op vrij lage temperatuur (8° C.) en geeft aan, dat de cellen hier gemiddeld 10 dagen in goeden staat bleven; hij concludeerde dit evenwel aan den toestand der cellen in het gefixeerde en gekleurde preparaat; amoeboide bewegingen noteerde hij alleen nog den 2^{en} dag. Bij de cavia degenereerden bij de cultuur in vitro op 38.5° de leucocyten snel. Op de resultaten van de cultuur in vivo kom ik in het laatste hoofdstuk terug.

Uit den laatsten tijd dateert het reeds eerder aangehaald onderzoek van L. HABERLANDT ⁴⁾, waarin hij mededeelt, kikker-leucocyten bij een temperatuur van 3—15° C. verscheiden weken in het leven te hebben gehouden in een physiologisch zoutmengsel, waaraan kikker-serum was toegevoegd. DEETJEN ⁵⁾ kon op kwarts met zijn fosphaatagar menschelijke leucocyten bij 15—20° C. eenige dagen in leven houden. Ten slotte is er nog de bekende mededeeling van JOLLY, die in verzegelde buisjes kikkerleucocyten bij lage temperatuur meer dan een jaar in leven hield ⁶⁾.

¹⁾ Arch. f. mikr. Anat. 1887, Bd. 30, p. 205.

²⁾ Verh. X. Intern. Med. Congr., 1890, Bd. II. Abt. III. S. 91.

³⁾ Mém. couronn. et autres mém. publ. par l'Acad. royal. de méd. de Belgique 18 Fasc. 8.

⁴⁾ Zeitschr. f. Biol. Bd. 69, p. 275, p. 331 en p. 409.

⁵⁾ Arch. f. (Anat. und) Physiologie 1906, p. 401.

⁶⁾ C. R. S. d. B., 1910. Vol. 69, p. 295.

Ik koos voor mijne proeven wederom de leucocyten van het paard, om te kunnen beschikken over een groot aantal cellen in zeer goede conditie. In een eerste proevenreeks werden deze driemaal met NaCl 0.9 uitgewasschen bloedlichaampjes in gesloten fleschjes in verschillende vloeistoffen gedaan, en zoo in de ijskast geplaatst. Om de 2 of 3 dagen werd van deze suspensies ongeveer 1 cc. bij serum $\frac{1}{6}$ gevoegd, en in dit milieu de phagocytose en de aanwezigheid van pseudopodien nagegaan, als criterium op het leven. Het verloop van de eerste proef laat ik hier in zijn geheel volgen:

Paardeleucocyten, welke een nacht in de citraatsuspensie hebben gestaan, worden na het gewone uitwasschen in gelijke hoeveelheden gevoegd bij 50 cc. 1) NaCl 0.9. 2) ultrafiltraat paard + CO₂. 3) paardeserum, in gesloten fleschjes, en hierin, zooals boven aangegeven, van tijd tot tijd de toestand der cellen onderzocht. Gedurende dat onderzoek bleven de fleschjes een paar uur op warme kamertemperatuur ($\pm 20-22^{\circ}$ C.), voor het overige voortdurend op 0° C. Bij het onderzoek is tevens de toestand der vloeistoffen in de fleschjes aangegeven, als de bloedcellen zijn bezonken, met het oog op haemolyseverschijnselen van de aanwezige roode bloedlichaampjes.

Het verloop was nu als volgt:

Na 1 dag:

De vloeistoffen boven de gesedimenteerde cellen zijn overal nog ongekleurd. Het phagocytoseonderzoek in serum $\frac{1}{6}$ geeft overal nog sterke phagocytose, nl.:

Serum-suspensie		$\frac{218}{230} = 94.7\%$
Ultrafiltraat-suspensie		$\frac{179}{197} = 90.8\%$
NaCl 0.9-suspensie		$\frac{209}{291} = 71.8\%$

Alle drie de soorten leucocyten hebben in serum $\frac{1}{6}$ nog sterke pseudopodien.

Hier zijn dus klaarblijkelijk de leucocyten overal nog in goeden staat; toch is in NaCl 0.9 al een geringe teruggang merkbaar.

Na 3 dagen.

Boven het sediment in NaCl 0.9 is een bruinroode, boven dat in ultrafiltraat een roode zoom, als teeken van haemolyse met en zonder omzetting der bloedkleurstof. Boven het serum is de vloeistof helder.

De phagocytose bedraagt in serum $\frac{1}{6}$ voor

Serum-suspensie	$\frac{151}{196} = 77 \%$
Ultrafiltraat-suspensie	$\frac{72}{134} = 53.7 \%$
NaCl 0.9-suspensie	$\frac{12}{143} = 8.3 \%$

Microscopisch zijn in het medium van de NaCl 0.9-suspensie geen roode bloedlichaampjes meer, de leucocyten zijn rond en eenigszins samenpakkend; ook in ultrafiltraat zijn slechts weinig roode bloedlichaampjes en ronde leucocyten; de leucocyten van de serumsuspensie hebben nog sterke pseudopodienvorming, tal v. roode bloedlichaampjes, geen samenballen der leucocyten.

Na 5 dagen.

NaCl 0.9: sediment geheel wit; hierboven een wankleurige bruinroode vloeistof. Ultrafiltraat: wit sediment met dun laagje roode bloedlichaampjes er boven, hierboven een zoom van helderroode haemoglobine-oplossing. Serum: geen haemolyse.

Phagocytose in serum $\frac{1}{6}$:

Serum	$\frac{131}{156} = 83.9 \%$
Ultrafiltraat	$\frac{26}{107} = 24.3 \%$
NaCl 0.9	$\frac{0}{310} = 0 \%$

Pseudopodienvorming: als te voren. In NaCl 0.9 absoluut gedegeneerde leucocyten.

Na 7 dagen. Phagocytose in serum $\frac{1}{6}$:

NaCl 0.9	Niet meer onderzocht
Ultrafiltraat	$\frac{27}{164} = 16.4\%$
Serum	$\frac{148}{199} = 74.3\%$

Pseudopodien en haemolyse: als te voren.

Na 10 dagen. Phagocytose in serum $\frac{1}{6}$:

Serum	$\frac{87}{219} = 39.7\%$
Ultrafiltraat	$\frac{12}{153} = 7.8\%$

In serum zijn nog enkele pseudopodien; in ultrafiltraat zijn de leucocyten absoluut gedegenereerd (niet meer ronde contour, korrelig, kern duidelijk zichtbaar).

Dus eerst na 10 dagen vinden we in serum een verzwakking van het phagocytosevermogen, tegelijk met een teruggaan van de pseudopodien-vorming.

Na 12 dagen was de phagocytose: serum $\frac{24}{200} = 12\%$, ultrafiltraat $\frac{0}{212} = 0\%$. Nu zijn ook in serum geen pseudopodien meer, maar overigens lijken de bloedlichaampjes nog goed geconserveerd; wel was er nu beginnende haemolyse.

Ik heb daarop door centrifugeeren het oude serum van de suspensie verwijderd, en vervangen door versch paardeserum, en 2 dagen later, dus 14 dagen na aanvang van de proef, werd wederom de toestand onderzocht. De phagocytose in serum $\frac{1}{6}$ bedroeg toen $\frac{57}{190} = 30\%$. Ook nu waren er echter geen duidelijke pseudopodien.

Een analoog resultaat verkreeg ik bij een tweede proef, waarbij vergeleken werden: NaCl 0.9, ultrafiltraat, neutraal ultrafiltraat, ultrafiltraat (neutraal) met $\frac{1}{5}$ serum paard en onverdund paardeserum.

Ook nu was onder den invloed van NaCl 0.9 na een paar dagen de phagocytose tot 10 % gedaald; in de andere vloeistoffen bleef zij gedurende 5 dagen op hetzelfde niveau; na 7 dagen was echter alleen in serum nog vrijwel absolute phagocytose met pseudopodienvorming en goed geconserveerde leucocyten. In al de andere vloeistoffen was wel is waar nog een phagocytose van 40—50 %, maar de leucocyten vertoonden duidelijke teekenen van degeneratie, balden samen, zonder duidelijke celgrenzen, en hadden geen pseudopodien meer. In het serum bleef daarop nog dagen lang de toestand volmaakt dezelfde.

Het resultaat is dus, zooals op grond van de vroegere proeven verwacht mocht worden:

Alleen bij aanwezigheid van de colloïden van het serum kunnen witte en roode bloedlichaampjes langeren tijd onveranderd buiten het lichaam bestaan. Hierbij is zelfs een concentratie der colloïden noodig, die niet veel minder is dan die in het serum; een geringere concentratie is niet voldoende. Bij zulk een onvoldoende colloïdgehalte gaat de cel te gronde, hetgeen bij het roode bloedlichaampje blijkt uit de haemolyse, en bij het witte bloedlichaampje tot uiting komt door het verlies van de amoeboïde bewegelijkheid, en spoedig daarop door het verdwijnen van de mogelijkheid tot phagocytose in daarvoor geschikt milieu.

Op een dergelijke gunstige werking der colloïden is voor verschillende lichaamsverrichtingen juist in de laatste jaren van verschillende zijden de aandacht gevestigd; het bleek, dat geen der z.n. „physiologische soluties” in den eigenlijken zin physiologisch kunnen zijn zonder de colloïden. Als we nu de mededeelingen in de litteratuur nagaan, rijst de vraag, of we in ons geval te doen hebben met een specifieke werking van de colloïden van het serum, dan wel met een eigenschap, die ook andere colloïden bezitten.

BAYLISS ¹⁾ betoogt, dat een injectie van een physiologische solutie tot herstel van den gedaalden bloedsdruk geen noemenswaard gunstigen invloed kan hebben, wanneer niet een colloid in voldoende concentratie is toegevoegd; de plaats van serum-colloiden kan hier zeer goed worden ingenomen door een sterke oplossing van gummi arabicum.

Reeds te anderer plaatse heb ik de mededeeling van FRIEDEMANN en SCHÖNFELD ²⁾ aangehaald, welke schrijvers wijzen op de noodzakelijkheid van de aanwezigheid van colloiden voor het tot stand komen van de amoeboide bewegelijkheid; ik heb daarbij tevens aangetoond, dat amoeboide protoplasmabeweging ook zonder colloiden mogelijk is.

Op het belang van de colloiden wijzen ook de interessante onderzoekingen van ROUS en TURNER ³⁾ over het conserveren van roode bloedlichaampjes buiten het lichaam; door toevoegen van gelatine aan de oplossing van RINGER konden zij de erythrocyten zeer langen tijd intact bewaren; het intact zijn er van werd aangetoond, doordat injectie van dergelijke cellen opnieuw in de bloedbaan geen haemolyse veroorzaakte.

Ook HABERLANDT ⁴⁾ kreeg bij zijn proeven over het levend bewaren van witte bloedlichaampjes de beste resultaten, als hij een colloid (gelatine of serum) aan de oplossing van RINGER toevoegde.

Het is nu wel voldoende gebleken, dat het dringend gewenscht is, voor een keukenzoutoplossing van 0.9 ‰ de benaming physiologisch weg te laten, waar we aan fijne reacties van de witte bloedlichaampjes zagen, dat nòch de al of niet

¹⁾ Intravenous injection in wound-shock. London. 1918.

²⁾ Bioch. Zeitschr. I. c.

³⁾ Proc. Soc. exp. Biol., XII, p. 106, 107, 122.

⁴⁾ I. c.

gewijzigde oplossing van RINGER, noch ook het ultrafiltraat het bloedserum kunnen vervangen.

Berust nu de gunstige werking van het serum alleen op de colloidwerking in het algemeen, zooals men afgaande op de juist aangehaalde mededeeling geneigd wordt te gelooven, of is hier een specifieke werking van serumcolloïden in het spel?

Ik heb in dit opzicht eerst de werking van gummi arabicum onderzocht, en wel in de eerste plaats door proeven in vivo: ik ging na, in hoeverre door toevoeging van gummi arabicum aan de ingespoten oplossing bij konijnen het snelle verval van de daardoor verkregen exsudaatleucocyten misschien kon worden tegengegaan. Ik bracht daartoe een 7% oplossing van gummi arabicum, zoowel in NaCl 0.9, als in ultrafiltraat, een paar malen achtereen bij konijnen in de buikholte, en onderzocht na een zekeren tijd de leucocyten op hun vermogen tot phagocyteeren; op dezelfde wijze gebruikte ik ook ultrafiltraat, verdund met konijneserum. Het betreft hier dezelfde proeven, welke ik ook gebruikte voor het nagaan van de intensiteit der emigratie (zie pag. 129 en volgende). De op die wijze verkregen leucocyten verkeerden evenwel alle in denzelfden toestand van regressie, onafhankelijk van de injectievloeistof, waarbij toevoeging van CaCl_2 aan NaCl 0.9 slechts een onbeduidende toename van phagocytose kan bewerken.

Ik vermeld hiervan slechts één proef in tabel LIX, waarin werden onderzocht leucocyten van 3 konijnen, welke een dag waren voorbehandeld resp. met NaCl 0.9, NaCl 0.9 + gummi arabicum en ultrafiltraat met gummi arabicum.

Eenige conserveerende invloed van het gummi arabicum was hier niet merkbaar; evenmin bleek me bij andere proeven in dit opzicht ultrafiltraat, al of niet verdund met serum, van invloed te zijn.

TABEL LIX.

De konijnen waren vooraf ingespoten met de volgende vloeistoffen:	De verkregen leucocyten werden op phagocytose onderzocht in:	Procentgetal leu- cocyten, welke amylum hebben opgenomen:
NaCl 0.9	NaCl 0.9	$\frac{0}{220} = 0 \text{ ‰}$
	NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.015 (neutraal)	$\frac{9}{223} = 4 \text{ ‰}$
NaCl 0.9 + gummi arabicum 7 ‰	NaCl 0.9	$\frac{0}{215} = 0 \text{ ‰}$
	NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.015 (neutraal)	$\frac{27}{290} = 9.3 \text{ ‰}$
Ultrafiltraat rund + gummi arabicum 7 ‰	NaCl 0.9	$\frac{0}{227} = 0 \text{ ‰}$
	NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.015 (neutraal)	$\frac{20}{288} = 6.9 \text{ ‰}$

Deze proeven zeggen in zooverre niet veel, omdat ik hier niet beschik over de vergelijking met den invloed, welke inspuiting van onverdund serum op de exsudaatleucocyten uitoefent.

Sprekender is evenwel de volgende proef in vitro, op dezelfde wijze verricht als de op pag. 181 e.v. vermelde; ik ging hierbij na den invloed van gummi arabicum, toegevoegd aan ultrafiltraat, op het conserveeren der leucocyten in vitro, vergeleken o.a. met serum. Van een op de gewone wijze gewasschen suspensie van paardeleucocyten werden telkens 2 cc. gevoegd bij:

- 1) 35 cc. paardeserum.
- 2) 35 cc. NaCl 0.9 + gummi arabicum 7 ‰.
- 3) 35 cc. versch ultrafiltraat van paardeserum (geneutraliseerd) + 7 ‰ gummi arabicum 7 ‰.

In deze proef is No. 2 eigenlijk niet geheel te vergelijken met de beide andere (zie hiervoor ook pag. 118); deze

oplossing bleek n.l. achteraf door de gummi arabicum sterker zuur te reageeren dan zuivere NaCl 0.9, hetwelk ongetwijfeld nadeelig zal hebben gewerkt. Daarentegen is No. 3 geheel neutraal van reactie, en dus goed te vergelijken met de serumwerking.

Phagocytose en amoëboïde bewegelijkheid werden van dag tot dag nagegaan in serum $\frac{1}{4}$.

Na 2 dagen was de toestand:

Haemolyse alleen in NaCl 0.9 + gummi arabicum.

Phagocytose in serum $\frac{1}{4}$:	{	Serum	$\frac{168}{234} = 71.7\%$
		Ultrafiltraat + gummi arab.	$\frac{154}{232} = 66.3\%$
		NaCl 0.9 + gummi arab.	$\frac{33}{198} = 16.6\%$

Uitloopers: alleen in serum en ultrafiltraat + gummiarabicum. Zooals gewoonlijk is in ultrafiltraat een veel sterkere agglutinatie der cellen dan in serum.

Na 4 dagen:

Phagocytose in serum $\frac{1}{6}$ na 15 min.:

$$\text{Serum:} \quad \frac{228}{298} = 76\%$$

$$\text{Ultrafiltr. + gummi arab.} \quad \frac{85}{185} = 45.9\%$$

Pseudopodien in serum zeer sterk. Ultrafiltraat: praktisch geen uitloopers meer.

Na 6 dagen zijn de uitkomsten ongeveer dezelfde als na 4 dagen.

Na 8 dagen evenwel is het verschil nog duidelijker geworden:

Phagocytose in serum $\frac{1}{4}$:

$$\text{Serum:} \quad \frac{236}{328} = 71.9\%$$

$$\text{Ultrafiltr. + gummi arab.} \quad \frac{45}{275} = 16.3\%$$

In ultrafiltraat + gummiarabicum is nu absolute haemolyse, en totaal verdwijnen der pseudopodien. In serum is de toestand nog geheel normaal.

We zien dus, dat ook de serumcolloïden een specifieke conserveerende werking uitoefenen, welke niet door andere colloïden geheel kan worden ve vangen.

HOOFDSTUK V.

IS DE PHAGOCYTOSE TE GEBRUIKEN ALS MAATSTAF TER BEOORDEELING VAN HET AL OF NIET LEVEN DER WITTE BLOEDLICHAAMPJES?

In het vorige hoofdstuk gebruikte ik o.a. de phagocytose als middel om te bepalen, of een leucocyt al of niet leefde. Nu hadden echter al de in het eerste hoofdstuk vermelde onderzoeken geleerd, dat naar allen schijn de phagocytose een proces is, dat vrijwel onafhankelijk staat naast de levensuitingen der cel, dat zij is een momentaan proces, dat zich voltrekt, als de oogenblikkelijk aanwezige verhoudingen tusschen cel, milieu en object van phagocytose daarvoor gunstig zijn. Hieruit volgt direct, dat de phagocytose op zich zelf geen maat kan zijn voor den invloed van een stof op het leven der cel, omdat zij niet alleen van dit leven afhankelijk is. Voorbeelden van het te kort schieten van de phagocytose in dit opzicht heb ik in vorige hoofdstukken te over aangehaald.

Als de intensiteit van de phagocytose evenwel niet direct evenredig is met de vitaliteit van de cel, is het toch nog zeer goed mogelijk, dat ten slotte toch alleen de levende cel als overigens de uitwendige omstandigheden gunstig zijn, tot phagocytose in staat is. Reeds vroeger is vermeld, dat afgaande op theoretische gegevens, de mogelijkheid, dat ook

afgestorven cellen phagocyteeren, moet worden toegegeven, en dat RHUMBLER zelfs die phagocytose door cellijken bij amoeben heeft kunnen constateeren.

De amoeben nu kunnen zeker niet vergeleken worden in alle opzichten, ook niet wat de phagocytose betreft, met witte bloedlichaampjes, zooals reeds op pag. 39 werd opgemerkt. Bij de amoeben is de phagocytose een middel tot voeding, bij de witte bloedlichaampjes, die door voedingstoffen zijn omgeven, is zij dit niet. Bij de amoebe is spontane phagocytose mogelijk, het witte bloedlichaampje kan bijna zonder uitzondering slechts opnemen dank zij bepaalde eigenschappen van het milieu. De amoebe kiest, zooals RHUMBLER met nadruk aangeeft, als zij levend is, haar voedsel in zekeren zin zelf uit, het witte bloedlichaampje wordt, naar allen schijn, veeleer passief volgestopt. Bij de amoebe zal dus met den dood der cel zeer zeker de phagocytose wijzigen, al blijft ze, zooals RHUMBLER opmerkt, in gewijzigden vorm passief soms mogelijk. Die meer passieve vorm is het, welke we ook veelal bij levende witte bloedlichaampjes zien. Is hier dan toch de phagocytose een specifiek kenmerk, dat alleen bij de levende cel gevonden wordt?

OUWELEEN ¹⁾, die ook de mogelijkheid aanneemt, dat doode cellen nog phagocyteeren, wijst in dit verband op de sterke phagocytose van kool, die men soms kan constateeren in sterk hypotonische zoutoplossingen, waar toch de cellen alle kenmerken dragen van degeneratie (samenballen, onduidelijke celgrenzen). Hij onderstelt daarbij echter tegelijk, dat in de meeste gevallen, dat de cel afsterft, de vloeibare toestand van de cel zal verdwijnen, en daarbij de mogelijkheid tot phagocyteeren, voor het tot stand komen waarvan de vloeibare toestand

¹⁾ Dissertatie, p. 233.

is de conditio sine qua non; het afsterven in hypotonische oplossingen zou dan een uitzonderingsgeval vormen.

In de vorige hoofdstukken heb ik mij op het standpunt gesteld, dat in 't algemeen de mogelijkheid om te phagocyteeren verloren gaat, als de cel is afgestorven. Als men dit aanneemt, zooals ik gedaan heb, zal de phagocytose dan toch in beperkte mate een oordeel kunnen geven over het leven der cel, in *zooverre als in een milieu, waarin de levende cel per se phagocyteert, uitblijven van deze phagocytose een criterium zal kunnen zijn voor den dood van de cel, en hierin de phagocytose zal stijgen, naarmate de cel in beteren toestand verkeert.*

Om dit evenwel te kunnen aannemen, moeten we eerst met andere middelen tevens nagaan, in hoeverre de cel hierbij werkelijk is afgestorven of leeft. Immers ook al is het eerste deel der stelling waar, dat niet phagocyteeren in gunstig milieu = dood der cel, dan behoeft op grond hiervan nog niet het tweede deel van de redeneering op te gaan, omdat we ons, zooals reeds gezegd, zeer goed vormen van afsterven kunnen denken met behoud van de phagocytose.

De moeilijkheid, om hier zekerheid te krijgen, bestaat hierin, dat het zeer lastig is, het oogenblik aan te geven, waarop de cel niet meer leeft. Men heeft voor de cel, en speciaal voor de leucocyten, verschillende levensteekenen. Zoo wordt de mogelijkheid tot pseudopodienvorming algemeen in dien zin opgevat; hierbij moet echter direct de beperking worden gemaakt, dat het ontbreken er van op zich zelf niets bewijst voor het dood zijn der cel; immers in vele vloeistoffen vormt ook de levende cel geen pseudopodien; we kunnen dus alleen zeggen, dat het ontbreken van pseudopodien in een daarvoor gunstig milieu een zeer sterke aanwijzing is voor den dood der cel.

Een ander middel heeft men in het gedrag van de cel tegenover z.n. „vitale kleurstoffen”. De doode cel heeft een gewijzigde affiniteit tot deze kleurstoffen; terwijl n.l. in de levende cel de kern ongekleurd blijft en de protoplasmagranulaties in wisselende intensiteit de kleurstof opnemen, blijven in de doode cel de granulaties ongekleurd, en neemt alleen de kern de kleurstof eenigermate op. Trouwens ook het scherp afgeteekend zijn van de kern in de niet gefixeerde cel geldt algemeen als een teken van afsterven.

Op grond van al deze verschijnselen mogen we werkelijk aannemen, dat de leucocyten, die na een verblijf gedurende eenigen tijd in NaCl 0.9, ultrafiltraat enz., niet meer phagocyteeren, ook werkelijk zijn afgestorven; de opalescentie van de vloeistof als teken van cellysis, het tot vormlooze hoopen op op elkaar kleven van vele cellen, het algeheel ontbreken van pseudopodien na overbrengen in geschikt milieu bewijzen dit; eveneens de kleurbaarheid met vitale kleurstoffen, waarvoor ik *neutraalrood* koos; na een verblijf van een paar uur in NaCl 0.9 kleurt de cel zich nog geheel als een levende cel, terwijl na een verblijf van 1—2 dagen de kleuring het karakter krijgt van die bij een doode cel; *de gewijzigde kleurbaarheid volgt dus de daling van de phagocytose op den voet.*

Een verdunning van serum met NaCl 0.9, bijv. in de verhouding $\frac{1}{5}$ is nu als 't ware een *standaardmilieu*, waarin normale leucocyten van alle door mij onderzochte dieren (mensch, paard, varken, konijn, cavia) maximaal phagocyteeren, als het object van phagocytose amyllum is; een abnormaal lage phagocytose zal hier dus wijzen op een slechte toestand van de cel.

Tot deze laatste conclusie zijn we echter niet meer gerechtigd, zoodra we, hetzij een ander object van phagocytose nemen, hetzij een niet serumhoudend milieu. Zoo is er gewoonlijk een duidelijke

phagocytose van kool in NaCl 0.9, maar deze is zeer wisselend, zonder dat men hier de reden kan zoeken in verschillende levensverhoudingen van de cel. Zoo bleek verder een phagocytose van amyllum aanwezig bij leucocyten in een NaCl—CaCl₂ milieu; we hebben gezien, dat deze phagocytose werkelijk een dalende lijn te zien gaf voor exsudaatleucocyten, naarmate we konden aannemen, dat ze in slechtere omstandigheden verkeerden. Toch is dit mengsel niet een standaardmilieu, zooals serum ¹⁾; immers leucocyten van andere dieren, zooals het paard, direct uit het bloed afkomstig, en dus qua vitaliteit zeker gelijkwaardig aan exsudaatleucocyten, geven in een NaCl—CaCl₂ mengsel een veel lagere phagocytose.

Nu ontbreekt me ter vergelijking in dit opzicht het gedrag der bloedleucocyten van het konijn; het is n.l. zeer goed mogelijk, dat deze zich zouden gedragen evenals die van het paard, en dat het geven van een maximale phagocytose in een CaCl₂ — NaCl mengsel alleen een eigenschap is, die exsudaatleucocyten in een bepaalde periode van hun bestaan kenmerkt, en later weer verdwijnt. Een oordeel hierover moet uitgesteld worden, tot ik gelegenheid heb gehad in dit opzicht bloed- en exsudaatleucocyten van één dier na te gaan, b.v. van het varken. Dat in dit opzicht niet alle diersoorten gelijk zullen reageeren, blijkt wel daaruit, dat PORGES ¹⁾ (zie pag. 25) voor cavia-leucocyten een maximale phagocytose zag in NaCl 0.9, terwijl de exsudaatleucocyten van het konijn dit niet doen, of hoogstens in een zeer kortdurend stadium. Ik zelf vond bij cavialeucocyten in NaCl 0.9 wel is waar niet de excessieve phagocytose van PORGES, maar zij was toch duidelijk veel sterker dan bij het konijn.

¹⁾ l. c.

Wanneer we ons nu evenwel bepalen tot een standaardmilieu, zooals serum $\frac{1}{6}$, is in dit milieu de mate van amylumphagocytose dan ook te gebruiken, om de werking van verschillende middelen na te gaan, waarvan de schadelijke werking voor het celleven vaststaat? Zal door al dergelijke middelen in concentraties, waarin de cel sterft, ook steeds de phagocytose verdwijnen? Wanneer werkelijk dit voor een aantal zeer verschillende middelen het geval zou blijken, zouden we bij beschikking over een groot aantal gegevens werkelijk met recht kunnen zeggen, dat in dit standaardmilieu niet alleen het ontbreken van phagocytose bewijst, dat de cel dood is, maar ook het omgekeerde, dat geen enkele doode cel meer phagocyteert, en dus de aanwezigheid van phagocytose bewijst, dat de cel leeft.

Om dit na te gaan moeten we de cellen eenigen tijd aan het middel blootstellen, daarna weer terugbrengen in serum $\frac{1}{6}$, hierin de mate van phagocytose bepalen, en tegelijk de kleurbaarheid van de cel door vitale kleurstoffen nagaan. Op die wijze toegepast, zou dan misschien de phagocytose een middel kunnen zijn, om de toxische werking van vergiften op lichaamscellen te meten, zooals men op geheel analoge manier werkende, met de cultuurmethode de bacteriedoodende werking van antiseptica bepaalt.

Op die wijze onderzoekende, bleek me ook werkelijk, zooals trouwens te verwachten was, dat de gewone fixatiemiddelen, zooals osmiumzuur en sublimaat, elke verdere phagocytose door de cel beletten, ook als deze stoffen in zeer zwakke concentratie hebben ingewerkt. De leucocyten blijven dan, in serum $\frac{1}{6}$ teruggebracht, bolvormig, adhaesie van leucocyten aan elkaar en aan amylum blijft geheel afwezig.

Dat we evenwel met het gebruiken van de phagocytose als maatstaf voor toxische werkingen toch voorzichtig moeten zijn,

bleek me, toen ik in de zelfde lijn het onderzoek ook uitstrekte tot stoffen, welke de cel geheel anders beïnvloeden, maar toch ook toxisch zijn, n.l. stoffen als chloroform, campher enz.

Vroegere onderzoekingen hadden ons geleerd¹⁾, dat deze stoffen, die in zwakkere concentraties de phagocytose van kool in NaCl 0.9 bevorderden, in grootere hoeveelheden die phagocytose remden, en zelfs absoluut tegenhielden; voor chloroform bedroeg die remmende concentratie ongeveer $1 \frac{1}{20000}$, voor campher werkt in elk geval de verzadigde oplossing remmend. Nu was hier vroeger eigenlijk niet de toxische concentratie bepaald, maar alleen die concentratie, welker aanwezigheid de phagocytose tegenhield, op de zelfde wijze, als men ook de concentraties bepaalt, die de ontwikkeling van bacterien tegenhouden, door n.l. de phagocytose te bepalen, terwijl de stof nog inwerkt. Ik mocht evenwel toch verwachten, dat in nog sterkere concentraties, b.v. $1 \frac{1}{500}$ voor chloroform, waarin zelfs haemolyse optrad van de roode bloedlichaampjes, ook de toxische werking op het witte bloedlichaampje nog wel aantoonbaar zou zijn, ook nadat het middel was weggenomen. Afgaande op mijn eerste proeven evenwel, leek dit absoluut niet het geval. Het bleek me namelijk, dat als ik leucocyten van het paard eenigen tijd behandelde met NaCl 0.9, chloroform in NaCl 0.9 $1 \frac{1}{500}$ (volumepercent), campher, verzadigd in NaCl 0.9, alcohol $10 \frac{1}{100}$ in NaCl 0.9, en daarna na uitwasschen al deze milieu's verving door serum $1 \frac{1}{10}$, dat dan overal maximale phagocytose aanwezig was en zelfs schenen er uitloopers te zijn (over deze uitloopers kon evenwel, daar de phagocytose maximaal was, niet best geoordeeld worden), terwijl de gelijktijdige behandeling met zwakke sublimaatoplossing elke verdere phagocytose tegenhield.

¹⁾ Zie o. a. H. J. HAMBURGER: Physik. Chem. Untersuchungen über Phagozyten, p. 144 en volgende.

De vroeger gevonden toxische concentraties schenen dus slechts *narcotisch* te zijn; na terugbrengen in een gunstig milieu scheen de werking te verdwijnen, en de cel weer normaal te worden, afgaande op de intensiteit van de phagocytose. Deze verklaring lijkt ook werkelijk het meest aannemelijk, en we zouden dus, zoo mogelijk, nog sterkere concentraties moeten kiezen, om ons doel (de toxische werking) te bereiken. Toch is men wel eenigszins huiverig, dergelijke cellen als levend te beschouwen, waar b.v. OVERTON¹⁾ aangeeft, dat kikkerlarven in chloroformoplossingen van $\frac{1}{4000}$ in enkele uren worden gedood.

Bij nadere beschouwing van een analoge proef kwamen er ook verschijnselen aan het licht, die maakten, dat ik ernstig ging betwijfelen, of werkelijk de cellen, die na de behandeling met chloroform $\frac{1}{500}$ nog maximaal konden phagocyteeren, op grond daarvan ook nog qua vitaliteit als volwaardig konden worden beschouwd.

Paardeleucocyten, welke 's nachts in serum-citraat hadden gestaan, werden na uitwasschen in gelijke hoeveelheden gevoegd bij NaCl 0.9 + CaCl 0.02 en NaCl 0.9 + CaCl 0.02 + chloroform $\frac{1}{500}$; beide vloeistoffen werkten $\frac{1}{2}$ uur in, waarvan ± 8 minuten op 37° C, de rest op kamertemperatuur. Daarna werden de inwerkende vloeistoffen vervangen door serum $\frac{1}{6}$, en met amylum $\frac{1}{2}$ uur op 37° C. geplaatst; daarna fixatie met osmiumzuur als gewoonlijk.

Het resultaat was geheel als boven aangegeven (Tabel LX).

Tegelijk ging ik echter in een contrôleproef, zonder amylum-toevoeging, de toestand, waarin in ander opzicht de leucocyten in serum $\frac{1}{6}$ verkeerden, na: het bleek, dat in N°. 1 nog vele

1) Studien über die Narkose, Jena, 1901.

TABEL LX.

Vloeistoffen, welke vooraf hebben ingewerkt :	Procentgetal der leuco- cyten, welke daarna in serum $\frac{1}{6}$ amylum heb- ben opgenomen :
1) NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.02	$\frac{141}{315} = 44.7\%$
2) NaCl 0.9 + CaCl ₂ 0.02 + Chloroform $\frac{1}{500}$	$\frac{161}{339} = 47.4\%$

roode bloedlichaampjes waren, de leucocyten een absoluut normaal voorkomen hadden en met sterke uitloopers waren gefixeerd; in N^o. 2 zijn geen roode bloedlichaampjes meer, de leucocyten zijn rond en vertoonen hier en daar neiging tot samenballen. Er was dus reden om te twijfelen, of, ondanks de sterke phagocytose, de leucocyten na chloroformbehandeling nog levend konden worden genoemd, en die twijfel werd nog sterker door het resultaat van de kleuring met neutraalrood, toen ik dezelfde proef herhaalde. In serum $\frac{1}{4}$ was weer de phagocytose gelijk:

- 1) NaCl 0.9 + CaCl 0.02 78.3 %.
- 2) Idem + Chloroform 69.7 %.

Behalve de zoeven genoemde verschillen was nu in de leucocyten van N^o. 2, die een gedegenereerd voorkomen hadden, duidelijk beginnende kleuring van de scherp gecontoureerde kern met neutraalrood, terwijl in N^o. 1 de kleuring met neutraalrood was als van een levende cel.

Hierbij doet de invloed, welke CaCl₂ blijkens een vroeger onderzoek¹⁾ op de vergiftiging met Chloroform uitoefent, in dit opzicht niets af; immers er is phagocytose, maar we moeten

¹⁾ H. J. HAMBURGER en J. DE HAAN: Livre jubilaire du professeur CH. RICHET, 1912, p. 141.

twijfelen, of de cellen, waarin deze phagocytose tot stand komt, nog leven.

Ik heb nog geen tijd gehad, dit verschijnsel nader te onderzoeken, b.v. door na te gaan, of de gechloroformeerde cellen, als we ze terugbrengen in serum, hier na eenigen tijd weer geheel normaal worden, dan wel spoedig, ook wat de phagocytose aangaat, het kenmerk van afgestorven cellen krijgen.

Het voorloopig onderzoek wettigt evenwel tot de conclusie, *dat het vermogen tot phagocyteeren niet altijd beperkt is tot de cellen, die nog in het volle leven staan.* Verder lijkt het me een treffend bewijs, dat de leucocyten zich bij uitstek er toe leenen, de verschillende werking van verschillende vergiften op het protoplasma te demonstreeren.

Afgaande op het voor chloroform gevondene is het nu zeer twijfelachtig, of b.v. de sterke phagocytose, die ik vond bij de witte bloedlichaampjes uit menschelijke pus (p. 83), of bij die van het paard na een verblijf van eenige dagen in ultrafiltraat (tabel p. 182) werkelijk plaats vond aan levende cellen; het gelijktijdige ontbreken van amoeboide beweging maakt dit op zijn minst twijfelachtig.

Uit al het voorgaande blijkt wel, dat onderzoekingen over phagocytose slechts onder zeer bepaalde omstandigheden iets zeggen over den toestand van de cel. Dit geldt, zooals we boven zagen, voor de werking van stoffen, die de phagocytose benadeelen, maar het geldt evenzeer voor de z.n. bevorderende werkingen op de phagocytose onder den invloed van bepaalde stoffen, welke toegevoegd worden aan een bepaald milieu, zonder daardoor dat milieu z.n. „minder physiologisch” te maken. Een dergelijke werking werd tot nu toe, ook door ons zelf, meestal nagegaan, door de phagocytose te bepalen, terwijl de stof nog inwerkt. Uit de resultaten, die men op die wijze

Uit al het voorgaande blijkt wel, dat onderzoekingen over phagocytose slechts onder zeer bepaalde omstandigheden iets zeggen over den toestand van de cel. Dit geldt, zooals we boven zagen, voor de werking van stoffen, die de phagocytose benadeelen, maar het geldt evenzeer voor de z.n. bevorderende werkingen op de phagocytose onder den invloed van bepaalde stoffen, welke toegevoegd worden aan een bepaald milieu, zonder daardoor dat milieu z.n. „minder physiologisch” te maken. Een dergelijke werking werd tot nu toe, ook door ons zelf, meestal nagegaan, door de phagocytose te bepalen, terwijl de stof nog inwerkt. Uit de resultaten, die men op die wijze

verkrijgt, kan men echter nooit tot een werking op het witte bloedlichaampje concludeeren, omdat de mate van phagocytose niet alleen bepaald wordt door de leucocyten, maar ook door milieu en object van phagocytose, en ook deze door toevoeging van de stof gewijzigde verhoudingen kunnen vertoonen. *Een zoodanige bevorderende werking is alleen dan bewezen, als ze nog tot uiting komt in de phagocytose, nadat de inwerkende stof is verwijderd en de leucocyten zijn overgebracht naar een standaard-milieu.* In al de gevallen, waarin, ook door mijzelf, b.v. een bevorderende werking van de koolphagocytose in NaCl 0.9 onder den invloed van Jodoform, Chloroform, Na-propionaat, CaCl_2 enz. enz. werd gevonden, is hiermee geen rekening gehouden.

Aan de propionaatwerking heb ik in dit proefschrift kunnen demonstreeren, hoe verschillend het resultaat kan uitvallen, al naarmate we in verschillend milieu werken.

Hiermee is niet gezegd, dat de resultaten dezer onderzoekingen nooit houvast geven. Er is reden om aan te nemen, dat onder den invloed van CaCl_2 , dat bij alle objecten van phagocytose en in alle milieu's de phagocytose steeds in denzelfden zin beïnvloedt, wel degelijk eenigermate de toestand van de cel zelf verandert, ook al ligt de wijze, waarop dat in dit geval plaats heeft, vooralsnog geheel in het duister. Op dezelfde wijze bestaat de mogelijkheid, dat ook stoffen als chloroform en andere in lipoid oplosbare stoffen, de leucocyten eenigermate blijvend wijzigen; alleen is door de vroegere proeven daarvan niet het bewijs geleverd; wel wijzen de enkele hier vermelde proeven over de chloroformwerking eenigermate in deze richting.

Hiermee heb ik allermint de bedoeling de beteekenis van de phagocytose voor het organisme als van minder belang te schatten. De wijzigingen, welke b.v. in het immuunserum

komen door de opsonische stoffen, hebben zeer zeker een groote beteekenis; alleen hier, zoo goed als bijna overal elders, zal deze werking het eigenlijke leven der cel niet raken.

Het is niet overbodig, hier nog eens met nadruk er op te wijzen, dat het geenszins geoorloofd is, phagocytose en amoeboïde bewegelijkheid eenigermate te identificeeren, zooals in vele leerboeken nog geschiedt; ik noem hier slechts BECHHOLD¹⁾ in de jongste uitgave van zijn leerboek.

Over de beteekenis van de phagocytose als functie in den levensloop van het witte bloedlichaampje kom ik in het volgende hoofdstuk terug.

¹⁾ Die Kolloide in Biologie und Medizin, 1919, p. 311—312.

HOOFDSTUK VI.

OVER DEN LEVENSLLOOP DER WITTE BLOEDLICHAAMPJES.

Waar ik in de vorige hoofdstukken voortdurend verschillende levensverschijnselen en levenseigenschappen der witte bloedlichaampjes naging, kwam ik van zelf sprekend ook eenigermate in voeling met de vraag naar de beteekenis van het leven dezer cellen voor ons lichaam, verder of voor de verschillende soorten witte bloedlichaampjes deze beteekenis dezelfde is en in hoeverre men van verschillende soorten witte bloedcellen kan spreken. Als ik in dit laatste hoofdstuk deze vraag in het kort bespreek, is het niet om dit onderwerp uit te putten; de litteratuurbeschouwing er over zou op zich zelf een boekdeel vullen, zooals ieder uit elke eenigszins langere monographie over het vraagstuk duidelijk is, waarbij dan nog overal de opmerking gemaakt wordt, dat naar volledigheid in dit opzicht niet is gestreefd. Ik zelf zie derhalve van een systematische behandeling der litteratuur geheel af, en zal hier in hoofdzaak alleen de meening weergeven, waartoe ik, geleid door het beschouwen van wat anderen vonden, en door mijn eigen onderzoekingen, langzamerhand gekomen ben. De schroom, waarmee ik het doe, is verklaarbaar, omdat men werkelijk moet aarzelen, te gaan roeren in dezen heksenketel van min

of meer tegenover elkaar staande meeningen, die reeds oorzaak waren van evenveel onverkwikkelijke disputen.

Nog steeds vinden we tegenover elkaar de vertegenwoordigers van de meening, dat al de schijnbaar verschillende witte bloedcellen terug te brengen zijn tot één stamsoort, die verschillende ontwikkelingsmogelijkheden heeft, en degenen, die twee of meer hoofdvormen onderscheiden, die absoluut niet in elkaar overgaan. Dat we hier nog steeds staan voor een niet uitgemaakte kwestie, is heel natuurlijk, omdat het een celsoort betreft, die uit den aard der zaak een object van strijd moet zijn. Het moet toch zeer moeilijk zijn, een specificiteitskwestie uit te maken van cellen, die plaatselijk niet streng van elkaar gescheiden zijn, maar waarvan juist een der fundamenteele eigenschappen is, dat ze overal zijn, en dat daarbij de verschillende variaties dooreengemengd zijn, zoodat bijna nergens in het lichaam één der soorten alleen voorkomt; we zijn dus niet in staat deze cellen in het lichaam vast te leggen, en kunnen nooit van een cel, die we ergens aantreffen, zeggen, van waar zij komt en waarheen zij zich begeeft. Uiterst verwarrend werkt daarbij, dat op grond van vaak ondergeschikte morphologische verschillen, vooral in affiniteit tot kleurstoffen, waarvan de betekenis in 't minst niet is uitgemaakt, het aantal celsoorten, dat door verschillende auteurs is uitgevonden, en waaraan een bepaalde naam is gegeven, legio is geworden. Een meer of minder sterke kleuring der celkern, een verschillende verklaring, gegeven aan allerlei zekere of minder zekere granulaties in het protoplasma, dit alles werd tot een bron van strijd van dien aard, dat het naslaan van de litteratuur hier speciaal een onverkwikkelijke bezigheid is geworden. Had men nu nog slechts te doen met de beide hoofdsoorten, de onvervalschte lymphocyt, en de uitgesproken neutrophiele z. n.

polynucleaire cel, dan zou alles nog eenigermate overzichtelijk zijn, maar ik behoef hier slechts de namen groote mononucleaire en overgangcel te noemen en alles wat hiermee al of niet vereenzelvigd wordt (clasmatoct, endotheelcellen van lymphbanen en bloedvaten, macrophagen), en ik roer evenzoovele „kwesties” aan, als ik namen heb genoemd.

De argumenten, welke voor de verschillende aangehaalde opvattingen dienst doen zijn velerlei; vaak wordt éézelfde verschijnsel aangeropen tot steun van twee tegengestelde meeningen. In het kort deze argumenten samenvattend, kan men zeggen, dat volgens de unitarische leer, welke wel het zuiverst door WEIDENREICH¹⁾ is weergegeven en zich vooral steunt op embryologische en vergelijkend anatomische gegevens en op het overal voorkomen van alle celsoorten, er geen streng onderscheid is tusschen de verschillende celsoorten, wat hunne afkomst aangaat; dat de lymphocyten en de daarmee overeenkomstige cellen in bloed en bindweefsel (macrophagen, endotheelcellen enz.) in het algemeen het jongere weefsel voorstellen, en dat daarnaast de gegranuleerde polynucleaire neutrophiele van dit type voorstelt de rijpe modificatie, die op het punt staat te degenereeren, waarvan de veelvormige kern het beginsymptoom is; dat tusschen beide uitersten in alle variaties voorkomen, die alle één stamvorm hebben, welke in den vorm, waarin zij zich kan deelen, wordt voorgesteld door de eenkernige cel met veel protoplasma. De specifisten (dualisten en z.n. polyphelisten) wijzen van hun kant op het zeker merkwaardige verschil in vorm tusschen de verschillende celsoorten in het bloed, en op het verschillend karakter der cellen in de regeneratieplaatsen, waardoor zij er toe komen, al het myeloïde weefsel in het beenmerg, al het

¹⁾ Die Leukozyten und verwandte Zellformen. Wiesbaden, 1911.

lymphoïde in de lymfeklieren te laten ontstaan, waarbij de milt in zekeren zin een plaats tusschen deze beiden in inneemt. De dualisten onderscheiden dan slechts twee vormen, de niet gegranuleerde en de wel gegranuleerde cellen; het is vooral NÆGELI, die als de woordvoerder van deze richting is te beschouwen. De polyphelisten (o.a. HELLY) zijn van meening, dat bij het volwassen individu al de verschillende gegranuleerde en niet gegranuleerde soorten alleen uit de eigen celvorm kunnen ontstaan. Dan is er nog het standpunt, dat als 't ware een schakel tusschen de andere vormt, dat n.l. wel is waar alle soorten één moedervorm hebben, maar dat daarvan de lymphocyten en de neutrophiele leucocyten twee verschillende takken zijn, die niet meer in elkaar kunnen overgaan. (PAPPENHEIM). Men zou al degenen, die over het onderwerp hebben geschreven, met meer of minder moeite in een der drie hoofdgroepen kunnen onderbrengen, hoewel het ook nog wel zou gelukken meerdere overgangsmeeningen afzonderlijk te classificeeren. De bestaande verwarring wordt nog vergroot, omdat nog vaak, als het gaat om een functie van witte bloedlichaampjes, gesproken wordt van deze cellen in 't algemeen, zonder de soort, waarvan sprake is, voldoende nauwkeurig aan te geven; dit is b.v. mede een der redenen, waarom de rol der leucocyten bij de spijsvertering in het darmkanaal nog zoo weinig nauwkeurig omljnd is.

Bij het ontstaan der leucocytentheorieën hebben de verschijnselen, welke men bij de exsudaatvorming heeft gevonden, een groote rol gespeeld; en waar ik zelf in de eerste plaats deze verschijnselen onder het oog kreeg, wil ik hierbij het eerst stilstaan. De beide uiterste celvormen, lymphocyten en neutrophielen, gedragen zich hierbij zeer verschillend. Trouwens, unitariërs zoowel als dualisten zijn het er wel over eens, dat, hoe dan

ook hunne afstamming mag zijn, deze cellen in hun wezen zeer veel verschillen. Van dit verschillend optreden bij de exsudaatvorming is de geheele ontstekingsleer doortrokken: de neutrophiliën zijn de specifieke emigratiecellen, die eerst nagenoeg het geheele ontstekingsexsudaat uitmaken en daarna snel verdwijnen, terwijl tegelijk de lymphoïde cellen dan meer op den voorgrond treden.

Alle onderzoekers zijn het erover eens, dat de polynucleaire cellen uit het bloed emigreeren; dit ligt in den aard der zaak, omdat deze celvorm normaal vrijwel alleen in het bloed voorkomt. Het wederom snel verdwijnen uit het exsudaat wordt meestal verklaard daardoor, dat deze cellen nu snel voor een groot deel te gronde gaan. Dit wordt afgeleid uit duidelijke teekenen van degeneratie, welke door tal van onderzoekers spoedig in deze cellen werden opgemerkt (WEIDENREICH, DOMINICI, HELLY enz.). Over de vraag, hoe sterk dit te gronde gaan plaats heeft, zijn slechts weinig speciale onderzoekingen verricht. Bekend is natuurlijk, dat in werkelijke abscessen een degeneratie in massa plaats heeft; maar toch wordt door velen stilzwijgend aangenomen en door anderen (WEIDENREICH) de mogelijkheid toegegeven, dat een deel in de weefsels verder kruipt; zoo meent b.v. MARCHAND, dat een deel op die wijze nog weer in de bloedbaan terecht zou kunnen komen. Veelal wordt in elk geval aangenomen, dat deze cellen in het weefsel nog langeren tijd levend en tot functies geschikt kunnen blijven. Verwarring van de verschillende witte bloedcellen of liever het niet afzonderlijk noemen van de bedoelde speelt hierbij vaak nog een rol. Zoo geeft b.v. HABERLANDT¹⁾, die de vertering van amylumkorrels in leucocyten beschrijft, niet aan, welke soort leucocyten

¹⁾ Pfl. Arch. 132, p. 175—204.

hij op het oog heeft, wat toch wel van beteekenis is, omdat, zooals straks zal blijken, ik bij konijnen van zulk een intracellulaire amyllumvertering weinig zag (Vergelijk p. 214).

Een eventueele terugkeer van de polynucleaire cellen in het bloed kan men zich op verschillende wijzen denken: de exsudaatcellen zouden, zooals reeds werd aangegeven, in het weefsel verder kunnen kruipen, en ten slotte via lymphvaten en lymphklieren weer in het bloed kunnen komen; men zou zich ook een immigratie terug in het bloed door de capillairwand kunnen denken; men vindt echter de mogelijkheid hiervan slechts vaag geopperd, afgezien natuurlijk van den massatoevloed bij het doorbreken van een abces in de bloedbaan. Uitgaande evenwel van de onderstelling, dat het witte bloedlichaampje bij de emigratie een zekere functie verricht, zou het in 't geheel niet ondenkbaar zijn, dat als de prikkel niet meer bestaat, de cel weer immigreerde. Deze gedachte heeft ongetwijfeld bij sommige onderzoekers voorgezeten, ter verklaring van het optreden van jodophile leucocyten in het bloed bij aanwezigheid van ontstekingshaarden in het lichaam. Zoo doet o. a. CZERNY¹⁾, die, zooals reeds vroeger vermeld, de jodophilie beschouwt niet als uiting van aanwezigheid van glycogeen, maar van een voortrap van het amyloid, hetwelk door de leucocyten gevoerd zou worden.

Een poging, om het duistere lot der exsudaatcellen verder te vervolgen, is afkomstig van ROBERT L. DIXON²⁾, die naging, of leucocyten, die in de buikholte verschenen als resultaat van een ontstekingsprikkel, ook in de circulatie terugkeerden, en zoo ja, langs welken weg dit dan geschiedde; hij ging daarbij

¹⁾ Arch. f. exp. Path., Bd. 31.

²⁾ Stud. fr. the ROCKEFELLER Instit. 17, 1913, p. 7.

uit van zienswijzen, welke in 't algemeen heerschen over de evacuatie van vreemde partikeltjes uit de buikholte. Hij verwekte daartoe bij honden terpentijnabscessen in de buikholte. Na verschillende tijden werden nu de dieren onderzocht, ten eerste, door uit een fistel van den ductus thoracicus aan den hals de verschillende celtypen van de daar afvloeiende lymfhe te tellen, en daarbij na opening van de buikholte ook het exsudaat op zijn celvormen te onderzoeken. Door verschillende honden zoo op verschillende tijden te onderzoeken, verzamelde hij zijn gegevens, waaruit hij het verloop van het exsudaat afleidde. Het exsudaat was eerst geel (na enkele uren) en bevatte slechts mononucleaire cellen. Aan het einde van den tweeden dag bevatte een exsudaat van 200 c. c. reeds 10000 cellen per mm^3 , die nog voor het grootste gedeelte mononucleaire waren. Eerst op den vierden dag begonnen de polynucleaire cellen te overwegen. Op den vijfden dag was het exsudaat verdwenen, en er bleef alleen een fibrinelaag over peritoneum, diaphragma, lever en milt. Daar terpentijn zeer sterk giftig is, zal dit de vorm der ontsteking in de eerste uren en dagen zeker beïnvloed hebben. De tellingen, welke de schrijver verrichtte van de cellen in den ductus thoracicus, zijn m.i. slechts van zeer betrekkelijke waarde, omdat hij den toestand op verschillende dagen na de injectie bij verschillende honden naging, en dus stilzwijgend onderstelt, dat alle dieren zich precies gelijk gedragen; de schrijver, die dit zelf inziet, is echter ook voorzichtig in zijn conclusies. Hij constateert, dat een duidelijke overgang van polynucleaire cellen in den ductus thoracicus niet is te constateeren, wel voor lymfhecellen en groote mononucleaire. Men houde hierbij in het oog, dat de hond een der weinige dieren is, waarvan de ductus thoracicus ook normaal een klein aantal neutrophiel gegranuleerde cellen bevat.

Verder bracht de schrijver pigment in de buikholte, en vond dan evenmin polynucleaire cellen met pigment in den ductus thoracicus en slechts enkele mononucleairen. Toch vond hij veel pigment gedeponeerd in retroperitoneale en mediastinale lymphklieren. Volgens D. schijnt dit er op te wijzen, dat de phagocyten een korteren en meer directen weg nemen, door de vreemde stof in de lymphklieren te deponeeren. Afgezien hiervan, dat de schr. ten onrechte hier bij voorkeur de polynucleaire cellen in dezen zin phagocyttaire en transport-eigenschappen schijnt te willen toeschrijven, is het me niet duidelijk, wat hier onder een kortere weg wordt verstaan, omdat de weg van de buikholte naar den ductus thoracicus toch ook over lymphklieren gaat. Schr. begaat de gewone fout, alle leucocyten, wat betreft hun phagocyttaire eigenschappen, over één kam te scheren, of liever hierbij aan de polynucleairen een hoofdrol toe te kennen, terwijl het toch bekend is, dat juist de macrophagen voor deze functie in verband met transport hoofdzakelijk gebruikt worden.

Waar het *lot* van de polynucleaire cellen dus nog niet geheel is opgehelderd, bestaat er aan den anderen kant strijd over de *herkomst* van de mononucleaire exsudaatcellen; de moeilijkheid is hier, dat deze celsoort onder verschillen van vorm, grootte en benaming niet alleen in het bloed, maar ook overal in het bindweefsel voorkomt. Een deel der onderzoekers houdt alle rondkernige exsudaat- en eveneens alle transsudaatcellen voor geemigreerd, anderen beschouwen ze als geheel of gedeeltelijk afkomstig uit de omgevende bindweefselementen en serosacellen. Tot de eerste categorie behoort HELLY¹⁾, die van oordeel is, dat alle mononucleaire exsudaatcellen

1) Wiener Klin. Wochenschrift, 1904, p. 639.

geemigreerd zijn, en de enkele, die afgestooten endotheelcellen zijn, degeneratieverschijnselen doen zien. Zoo meent ALMKWIST ¹⁾ hetzelfde op grond hiervan, dat in de eerste uren het exsudaat alleen lymphocyten bevat, zooals we ook door DIXON zagen vermeld. SCHWARZ ²⁾ kon zelfs ontwijfelbaar de emigratie van mononucleaire cellen constateeren bij experimenteel teweeggebrachte keratitis aan het konijnen oog; hij vond in de allereerste beginstadia van de ontsteking de capillairen in de omgeving zeer hyperaemisch, daarin en in de grootere bloedvaten, wandstandig gerangschikt, zeer vele leucocyten opgehoopt, en daaronder zeer vele mononucleaire cellen, die gemakkelijk waren te herkennen. Ook MAXIMOW ³⁾ constateerde met zekerheid emigratie van deze cellen. Degenen, die zooals NAEGELI ⁴⁾ op het voorbeeld van EHRLICH aan de lymphocyten in het algemeen nog steeds de mogelijkheid van amoëboïde bewegelijkheid ontzeggen, vinden voor deze meening steun bij de onderzoekers, die het er voor houden, dat de mononucleaire cellen van het exsudaat alle uit het bindweefsel der omgeving afkomstig zijn, of ten minste grootendeels, zonder dat natuurlijk omgekeerd deze laatste onderzoekers overigens het dualistische standpunt van NAEGELI behoeven in te nemen. Al naarmate men onderscheid maakt tusschen endotheelcellen en verschillende bindweefsel-elementen, laten deze categorie van onderzoekers die cellen nog op verschillende plaatsen ontstaan: MARCHAND ⁵⁾ b.v. noemt de hoofdmassa der macrophagen niet afkomstig van

¹⁾ Virch. Arch. Bd. 169, p. 17.

²⁾ Wien. Klin. Woch. 1904, p. 1173.

³⁾ ZIEGL. Beiträge Bd. 38, p. 301.

⁴⁾ In de jongste uitgave van zijn leerboek noemt trouwens ook NAEGELI de emigratiemogelijkheid van lymphocyten ontwijfelbaar bewezen.

⁵⁾ Verh. Deutsch. path. Ges. 1898, p. 63.

het dekendotheel, maar van z.n. adventitiacellen der vaten. DOMINICI¹⁾ is op het voorbeeld van RANVIER van oordeel, dat de groote mononucleaire trans- en exsudaatcellen losgelaten elementen van het net zijn, evenals b.v. SCHOTT, WEIDENREICH en BEATTIE. Al deze onderzoekers noemen de mononucleaire cellen degene, die de meeste resistentie hebben, in bindweefsel het best levensvatbaar zijn.

Beide vraagstukken, zoowel betreffende de herkomst der mononucleaire als omtrent het verdere lot der polynucleaire exsudaatcellen, was ik in de gelegenheid aan de door mij veroorzaakte exsudaten te bestudeeren. In de eerste plaats was ook bij mijne konijnen te constateeren, dat bij een konijn, dat niet eerder was gebruikt, de vloeistof in de buikholte enkele uren later spaarzaam dezelfde celementen bevat, als normaal, n.l. grootere en kleinere, maar vooral grootere cellen met rondachtigen kern, (soms tweekernig), zonder jodophile granulatie. Naar allen schijn is de ingebrachte vloeistof dan reeds weder geresorbeerd, vóór de echte emigratiecellen de buikholte hebben bereikt. Een tweede injectie, en verder bij latere proeven aan hetzelfde dier ook een eerste injectie bewerkt echter na enkele uren een algeheele wijziging in het type der exsudaatcellen: de vloeistof bevat voor veel meer dan 90 % uitsluitend polynucleaire, grof gegranuleerde leucocyten, welke granulaties sterk jodofiel zijn; het absolute aantal dezer cellen is des te grooter, naarmate de voorbereidende injecties talrijker zijn. Dit sneller optreden van de polynucleaire cellen na de 2^e en bij vaker gebruikte konijnen na de eerste injectie moet misschien worden toegeschreven aan het feit, dat ze reeds na de voorafgaande injectie waren

¹⁾ Compt. Rend. Soc. Biol. 53, p. 890.

geëmigreerd, maar nog niet de buikholte hadden bereikt, toen reeds de vroegere prikkel tot emigratie ophield te bestaan. Hevelt men echter het exsudaat eerst uit enkele dagen na de eerste injecties, of wel gebruikt men een reeds vaker voorbereid konijn, dan komt het weer eenigermate tot een vermeerdering van de mononucleaire elementen, welke dan 10—20 „ van het totale aantal kunnen uitmaken.

Hiermee is evenwel niet gezegd, dat ook deze cellen uit het bloed afkomstig zijn; integendeel er zijn zeer duidelijke aanwijzingen, dat dit niet het geval is, en men is als 't ware gedwongen tot deze slotsom te komen, *juist als men voor de lymphocyten van het bloed de mogelijkheid van emigratie volhoudt, waaraan op grond van zooeven aangehaalde nauwkeurige onderzoeken m.i. niet valt te twifelen.* Tot deze conclusie komt men, als men de quantitatieve samenstelling van de witte bloedcellen van het konijnenbloed in het oog houdt, en tevens de begrenzen weefsels van de buikholte na een injectieproef onderzoekt. In deze richting heb ik eenige proeven verricht, in de hoop, dat hierbij tevens mogelijkerwijze iets naders kon worden gevonden omtrent het lot der polynucleaire exsudaatcellen, en en van hetgeen geschiedde met amylum, dat door deze cellen was opgenomen.

Bij een konijn wordt vooraf het totale aantal witte bloedlichaampjes in het bloed bepaald op 7500 per mm^3 ; daarna wordt in de buikholte ingespoten 1.5 gram stijfsel op 200 cc. NaCl 0.9; deze inspuiting wordt den volgenden dag herhaald, waarbij vooraf is geconstateerd, dat het aantal leucocyten in het bloed is gestegen tot 14700; $3\frac{1}{2}$ uur na de tweede injectie, als een exsudaat, rijk aan leucocyten, in de buikholte mag worden verwacht, wordt nu bovendien nog ingespoten 100 mgr. amylum op 60 cc. NaCl 0.9%, ten einde de leucocyten in vivo in de gelegenheid te stellen te phagocyteeren. Gedurende de volgende dagen verrichtte ik nog een bloedonderzoek, waarbij tevens eenigszins werd gelet op de

verhouding tusschen lymphocyten en polynucleaire cellen. Ik noteerde na 1 dag: totaal aantal 9300, overwegend kleine en grootere lymphocyten; na 2 dagen: 21000, waarbij naast een groot aantal mononucleaire cellen, ook vele polynucleaire aanwezig waren. Drie dagen na de laatste injectie wordt de stijfselinspuiting, wederom gevolgd door het inbrengen van 200 mgr. amylum, herhaald. Wederom 3 dagen later werd nu eerst de buikholte bij het konijn uitgespoeld met 100 cc. NaCl 0.9‰; op die wijze werd verkregen een vrij troebele vloeistof, waarvan de cellige elementen voor verreweg het grootste gedeelte gevormd werden door grootere en kleinere macrophagen, naast een gering aantal microphagen. Slechts een onderdeel van beide celsoorten bevatte (niet veranderde) amylumkorreltjes; een deel der macrophagen had microphagen opgenomen. De microphagen waren sterk jodophiel, de macrophagen ook in geringe mate.

Dus 3—6 dagen nadat zonder twijfel een zeer sterk exsudaat van polynucleaire cellen in de buikholte was opgetreden, is hiervan bij uitspoelen niets meer te vinden: de cellige inhoud van de buikholte heeft nagenoeg weer geheel het karakter van het normale transsudaat. Het onderzoek van de buikholte zelf leerde nu, wat er van deze polynucleairen en van het amylum was geworden:

Bij opening wordt direct subperitoneaal ventraal ongeveer in het mediaanvlak een witte massa zichtbaar, van $\pm$ 5—6 cM. doorsnee en ongeveer 1—2 mM. dikte. Een dergelijke witte plek, maar veel kleiner, bevindt zich op de lever, zóó los er mee verbonden, dat hij er gemakkelijk van kan worden losgepeld. Ook op het mesenterium zijn enkele kleine plekjes. Alle bestaan oogenschijnlijk uit amylum. Overigens is de buikholte iets hyperaemisch, maar bevat geen vrij vocht.

Van de witte massa ventraal en op de lever worden, na fixatie in sublimaat-formol, ijs- en paraffinecoupes gemaakt, die het volgende leeren: de witte massa ligt subperitoneaal, en bestaat nagenoeg geheel uit genecrotiseerde of necrotiseerende cellen, waarvan meerendeels alleen nog kernresten in druppels van verschillende grootte zichtbaar zijn; hiertusschen ligt onveranderd een groot aantal onveranderde

amylumkorrels. De witte massa blijkt te zijn ingesloten door één of meer cellagen, welke op grond van de overgang naar de omgeving duidelijk afkomstig zijn van woekerende endotheliumcellen, welke zich hebben afgerond en hier en daar neiging vertoonen uit het verband los te laten. Deze woekerende cellen zijn voor een gedeelte volgepropt met amylumkorrels. Naar den kant van de buikspieren volgt nu in het subperitoneale bindweefsel het gewone type van granulatiweefsel, met fibroblasten, jonge capillairen en verder talrijke eosinophile cellen; hierin is geen amylum intra- of extracellulair meer te vinden.

De woekerende endotheelcellen komen volmaakt overeen met de cellen, welke 's morgens in de spoelvloeistof waren gevonden: bij beide had het protoplasma een sterke affiniteit tot haematoxyline en methyleenblauw en een sponsachtige structuur.

In een uitgespreid laagje mesenterium bleken een groot aantal polynucleaire leucocyten in goeden staat aanwezig te zijn. Hier, noch in de onderzochte regionale lymphklieren werd amylum gevonden in de diepte van het weefsel; wel lagen oppervlakkig op het mesenterium vele amylumkorrels, klaarblijkelijk intracellulair in macrophagen.

Uit deze proef kunnen we de volgende conclusies trekken: de millioenen polynucleaire leucocyten, welke aanvankelijk het exsudaat bevolkten, zijn na 3—6 dagen reeds nagenoeg alle absoluut te gronde gegaan, en als levend materiaal uitgeschakeld; ze zijn zóódanig omgroeid door lichaamsweefsel, dat bij het uitspoelen van de buikholte nagenoeg niets wordt teruggevonden. Ze zijn, zooals ook uit andere proeven bleek, met het later ingebrachte amylum ten deele eenvoudig passief geagglutineerd of voor het grootste gedeelte, gehoor gevende aan de zwaartekracht, bezonken op de voorste buikwand; van deze afgestorven cellen ging geen duidelijke verterende invloed op het mede aanwezige amylum uit; wel veroorzaakt de neergeslagen massa een productieve ontsteking in de omgeving, waarbij ook de aangrenzende endotheelcellen woekeren; op deze woekering berust

klaarblijkelijk ook de latere aanwezigheid van vele macrophagen in de buikholtevlloeistof.

Dat op deze wijze werkelijk de hoofdmassa der polynucleaire witte bloedcellen is getroffen, blijkt wel daaruit, dat van een verplaatsing van een deel van het amylum tot binnen in het omgevende weefsel door middel dezer microphagen geen sprake is, hoewel ze toch ongetwijfeld voor een groot deel zullen hebben gefagocyteerd. We moeten dus aannemen, dat deze cellen, eenmaal in de buikholte gekomen, hun verder zwervvermogen hebben ingeboet; een ten overvloede ingesteld onderzoek in het bloed op amylum-houdende leucocyten bij op dergelijke wijze behandelde konijnen leverde ook, zooals verwacht werd, een negatief resultaat op.

Ik heb de proef op analoge wijze herhaald bij een tweede konijn, maar nu bij het gevormde exsudaat in plaats van amylumkorreltjes gebracht een fijne emulsie van olijfolie, verdund met een serumverduunning; de olijfolie-bolletjes had ik rood gekleurd met Sudan III, ten einde ze een teeken te geven voor gemakkelijk herkennen. Ik ging hierbij uit van de gedachte, dat misschien de amylumkorreltjes mechanisch een verdere voortbeweging der leucocyten, welke de korrels hadden opgenomen, zouden kunnen verhinderen, welke factor voor het vloeibare vet in veel mindere mate zou gelden. Het resultaat was evenwel precies hetzelfde: bij punctie van de buikholte na een paar dagen kwam een exsudaat met relatief veel macrophagen te voorschijn, van welke laatste een groot deel microphagen had gefagocyteerd, en die verder nagenoeg alle vol (reeds ongekleurde) kleine vetdruppeltjes zaten, waardoor wederom het basophile protoplasma een duidelijke schuimstructuur verkreeg. Toen na zes dagen het konijn werd gedood, bevond zich op verschillende plaatsen om de buikholte een scharlakenrood getint neerslag,

in het net, op het coecum, maar vooral weer ventraal subperitoneaal. Het laatste werd microscopisch onderzocht en leverde een beeld, geheel analoog aan dat, hetwelk zoo juist voor amyllum is beschreven; verder waren de zeer talrijke vetdruppels in het midden tusschen de leucocytenkernen nog geheel gekleurd door Sudan III, terwijl de omgevende endotheelcellen (macrophagen) ongekleurd vet bevatten naast roode kristallen; in tegenstelling met amyllum had dus het Sudan III-vet in de macrophagen wel een verandering ondergaan. Verder was in de buikholte al het mesenteriale en subperitoneaal aanwezige eigen vet van het dier rose getint door Sudan III, welke tinctie ook microscopisch zichtbaar was. Wederom bleek van een voortdringen der microphagen met Sudan III niets; ook in het bloed was op geen enkel tijdstip Sudan III-vet in leucocyten waarneembaar.

Ook wanneer ik evenwel experimenteel bij konijnen een sterk exsudaat verwekte, de polynucleaire cellen hiervan in of buiten het lichaam amyllum of vet met Sudan III liet opnemen (ook het laatste geschiedde prompt bij gelijktijdige aanwezigheid van serum), en daarna deze tallooze exsudaatleucocyten wederom in het bloed bracht, door inspuiting in een oorvene, kon ik reeds na zeer korten tijd ($\frac{1}{2}$ —1 uur) in het bloed de ingebrachte cellen niet meer terugvinden; ze schijnen dus ergens te worden vastgehouden, en in het stroomende bloed niet meer bestaanbaar te zijn. Dus het niet vinden van leucocyten, die gefagocyteerd hebben, in het bloed, bewijst op zichzelf niet, dat ze er niet geweest zijn; wel wordt dit laatste echter zeer onwaarschijnlijk, als men het ongehoord groote aantal afgestorven cellen in de buikholte in aanmerking neemt.

Natuurlijk blijft nog de mogelijkheid, dat het te gronde gaan der cellen bevorderd werd door het tegelijk aanwezige amyllum of vet; maar ook, als ik een exsudaat verwekte alleen door

NaCl 0.9 met stijfsel, vond ik na eenige dagen een grijs beslag aan de ventrale buikwand, bestaande uit leucocyten; wel was hier het volume der massa veel geringer, maar er is alle aanleiding om aan te nemen, dat de cellen hier veel minder plaatselijk, maar meer diffuus zullen zijn neergeslagen.

In verband ook met al de degeneratieverschijnselen, die ik vroeger aan exsudaatcellen heb waargenomen, mogen we m.i. wel aannemen, dat van al de polynucleaire leucocyten welke in het exudaat aanwezig waren, na korten tijd niets meer over is; alleen een deel, dat in het mesenterium in goeden toestand van kleurbaarheid werd aangetroffen, schijnt hiervan te zijn uitgezonderd. Voorloopig wil het me echter waarschijnlijker voorkomen, dat deze laatste niet op weg zijn van de buikholte, maar juist op weg naar de buikholte.

Ook A. BLUMENTHAL (vergelijk ook pag. 180) zag bij zijn cultures in vivo in collodionzakjes, zoowel bij kikkers als caviae na korteren of langeren tijd degeneratie optreden vooral aan de gegranuleerde cellen; hij noemt daarom ook de mononucleaire cellen die, welke neigen tot organisatie, en de gegranuleerde die, welke neigen tot degenereeren.

Wat nu de *mononucleaire* cellen betreft, de vergelijking van deze cellen in de exsudaatvloeistof met de gekleurde coupe leert wel, *dat deze cellen in elk geval grootendeels plaatselijk zullen zijn gevormd*; dit blijkt nog duidelijker uit het volgende: bij een konijn, waarbij 6 dagen geleden een exsudaat was opgewekt, maar niet uitgeheveld, werd opnieuw stijfsel ingespoten, en na $\pm$ 18 uur het nu nieuwe exsudaat uitgeheveld; dit bevatte naast de normale polynucleaire cellen in overmaat ook talrijke macrophagen, waarvan echter het grootste gedeelte één of meer (soms 4) polynucleaire cellen had opgenomen; de laatste waren bijna steeds nog in hun geheel aanwezig, soms ook alleen kernstukjes; ze

waren duidelijk herkenbaar aan de nog uitgesproken jodophilie er van te midden van het overigens veel minder jodophile protoplasma der macrophagen. Dit constateerende zijn we gedwongen aan te nemen, dat de hier aanwezige macrophagen reeds gevormd zijn na de vorige injectie en niet afkomstig van een versche emigratie uit de bloedbaan. Op dat verschijnsel berust dus het relatief steeds grooter worden van het aantal mononucleaire cellen na herhaalde injectie.

Deze proeven bevestigen dus de vroeger aangehaalde meening van DOMINICI e.a., dat de hoofdmassa van de in het exsudaat aanwezige mononucleaire cellen lokaal ontstaan.

Hiermee wil ik echter geenszins beweren, dat een mononucleaire cel niet kan emigreeren; het vroeger aangehaalde onderzoek van SCHWARZ, MAXIMOW, e.a. lijkt me integendeel hiervoor voldoende bewijzend; en spoedig zal blijken, dat juist mijn eigen proeven aantonen, dat naar allen schijn de lymphocyten uit het bloed in grooten getale emigreeren.

In elk geval zien we ten overvloede nogmaals bewezen, dat *het lymphoïde celttype buiten de bloedbaan veel beter bestaansvoorwaarden vindt dan het polynucleaire. Verder kunnen we zeggen, dat de polynucleaire cel, die gefagocyteerd heeft, niet weer in de bloedbaan terugkeert, en dat, wanneer hij er kunstmatig in wordt teruggebracht, hij direct weer uit het stroomende bloed verdwijnt.*

Ik kom nu terug op de zoo juist aangestipte emigratiemogelijkheid der lymphocyten. Wanneer SCHWARZ ¹⁾ in de eerste uren na exsudaatvorming hoofdzakelijk lymphocyten in het exsudaat vond en tevens op microscopische doorsneden een sterke opeenhooping van witte bloedlichaampjes in de

¹⁾ l. c.

ontstoken venen met emigratie ook van mononucleaire cellen, bewijst dat nog niet, dat de in het exsudaat later aanwezige lymphoïde cellen van emigratie afkomstig zijn; immers dit soort cellen komt in grooten getale overal in het bindweefsel voor; wel is deze conclusie aangewezen voor de polynucleaire cellen, daar deze normaal in het bindweefsel niet aanwezig zijn. De moeilijkheid, die hier elke zekere bewijsvoering tegenhoudt, is, dat men bepaalde cellen op een bepaalde plaats niet een kenmerk kan geven, waardoor ze niet geschaad worden, en waardoor men ze toch gemakkelijk in hun loop kan vervolgen.

Om het verloop van de exsudaatvorming tenminste eenigermate te kunnen beoordeelen, heb ik nu nagegaan, op welke wijze zich de witte bloedlichaampjes van het bloed kwalitatief en quantitatief gedroegen na de injectie van vloeistof in de buikholte; ik mocht verwachten, dat het bloed de sporen van de emigratie zou toonen; immers het aantal cellen, dat zich ten slotte in het exsudaat ophoopte, was vaak even groot als het aantal, dat op een gegeven oogenblik kon geacht worden, in de totale bloedmassa voorhanden te zijn. Voor zoover ik kon nagaan, is een dergelijk systematisch bloedonderzoek door vroegere onderzoekers nooit tot een onderwerp van een speciale studie gemaakt, behoudens dan enkele algemeene opmerkingen; zoo vermeldt b.v. TSCHERNORUZKI ¹⁾, die exsudaat-leucocyten onderzocht op de aanwezigheid van diastatische fermenten, en die tot dit doel honden in de pleuraholte een aleuronaatstijfselbrij injecteerde, dat in den eersten tijd de honden reageerden door een hypoleucocytose.

Meer dan het constateeren van de emigratie van een enkele lymphocyt zal de verandering van het lymphoïde bloedbeeld

¹⁾ Zeitschr. f. Physiol. Chemie, **75**, 216.

eenig inzicht kunnen geven over de mate, waarin de lymphocyten uit het bloed aan de exsudaatvorming deelnemen. Immers wanneer bij een systematisch onderzoek men vindt, dat na een injectie, maar ook alleen na die injectie, een constante verandering in het aantal bloedlymphocyten optreedt, zal men gevoelig kunnen aannemen, dat deze verandering de injectie tot oorzaak heeft.

Daar bij mijne proefinrichting de exsudaatvorming, dus de onttrekking van de witte bloedlichaampjes en masse, willekeurig vaak herhaald kan worden, leent zij zich tot het bovenbedoelde onderzoek uitstekend.

Zelf heb ik hier slechts enkele algemeene proeven verricht. Ik had kunnen constateeren, dat in de eerste uren na de injectie het aantal leucocyten van 7500—10000 daalt tot 2000—3000, om dan in den loop van een dag weer langzamerhand te stijgen. Uit de op pag. 212 vermelde proef heeft men kunnen zien, dat daarna vaak een lichte kortdurende hyperleucocytose optreedt, die evenwel ook weer spoedig teruggaat.

Het verdere nauwkeurige onderzoek van het gedrag der verschillende witte bloedcellen als reactie op de injectie heeft verder de Heer K. J. FERINGA op zich genomen. Dit onderzoek moet uit den aard der zaak in vele richtingen gaan, omdat natuurlijk het veranderde bloedbeeld alleen niets leert omtrent de plaats, waar de bloedlichaampjes, die niet meer in het stroomende bloed zijn te vinden, tenslotte terecht komen. Het onderzoek verkeert dan ook nog slechts in zijn beginstadium, maar ik wil een enkel interessant voorloopig resultaat hier aanhalen, omdat het m.i. het vooruitzicht opent, dat ons inzicht in den kringloop van het leucocytenbestaan er door verduidelijkt wordt, en het daardoor past in het kader van deze beschouwing.

De samenstelling van normaal konijnenbloed bleek, zooals ook sommige andere onderzoekers aangeven¹⁾, vrijwel constant, wat het aantal polynucleaire cellen en lymphocyten aangaat, ongeveer omgekeerde verhoudingen te vertoonen als bij den mensch, n.l. 65—75 % lymphocyten en 20—25 % polynucleaire cellen; de onderzochte konijnen waren 1 jaar oud of ouder; de gevonden cijfers varieerden slechts weinig. In het bloed spelen dus de lymphocyten een hoofdrol. Wat gebeurt er nu bij de exsudaatvorming na de injectie? Zooals vroeger is aangegeven, moeten de neutrophiele cellen, welke in de buikholte de overwegende meerderheid vormen, uit het bloed afkomstig zijn, en wel direct, als het konijn voor het eerst is behandeld; hoewel nu het aantal specifiek gegranuleerde cellen van het exsudaat na een dag vaak grooter is dan het totale aantal witte bloedcellen in het bloed, zijn de veranderingen, die men in het bloed aantreft, daarmee niet in overeenstemming. Het totale aantal witte bloedlichaampjes daalt wel is waar tot ongeveer $\frac{1}{3}$; in dit aantal is echter de verhouding lymphocyten: leucocyten absoluut niet gewijzigd, terwijl men toch zou verwachten, dat een eventueele verandering zich in de eerste plaats zou demonstreeren aan de polynucleaire cellen, vooral waar die reeds vooraf niet zeer talrijk zijn. Het verlies aan witte bloedcellen in het stroomend bloed, dat op zichzelf zeer goed in overeenstemming is met het aantal exsudaatcellen, betreft alle witte bloedcellen in de verhouding, waarin ze in konijnebloed aanwezig zijn, dus voor het overgrootste meerendeel alleen lymphocyten.

¹⁾ De daarvoor door WEIDENREICH verzamelde cijfers (zie WEIDENREICH, l. c., p. 121) loopen buitengewoon sterk uiteen. Met de door ons gevonden waarden komen zeer mooi overeen de door JÖRGENSEN (Skand. Arch. f. Physiol., XXXII, 4/6, p. 253) medegedeelde getallen.

Het verlies wordt in den loop van een dag grootendeels weer aangevuld, soms zelfs met overcompensatie, waarbij als men het bloed voortdurend controleert, het aantal polynucleaire cellen procentsgewijze meestal iets toeneemt. Een hernieuwde injectie na 1 dag heeft nu weer dezelfde daling van het aantal witte bloedcellen ten gevolge. Herhaalt men nu na 1 of 2 weken de injectie, terwijl het eerste exsudaat geheel is verdwenen, dan hebben we reeds 3 uur later een voldoende exsudaat van polynucleaire cellen, terwijl wederom het bloed in hoofdzaak lymphocyten verliest.

Wanneer men dit resultaat onbevangen gaat beschouwen, zonder vooringenomenheid tegenover hetzij unitarische of dualistische theorieën, ligt in deze cijfers toch wel een zeer sterke aanwijzing, dat de scheiding tusschen gegranuleerde cel en lymphocyt niet zóó groot kan zijn, als men, alleen afgaande op het zeer groote verschil in celtype, zou kunnen meenen. Immers we worden als 't ware gedwongen tot de gedachte, dat, daar de polynucleaire cellen van het exsudaat uit het bloed afkomstig moeten zijn en dit bloed in hoofdzaak alleen lymphocyten verliest, die lymphocyten ergens op hun weg naar het exsudaat tot polynucleaire cellen moeten zijn geworden. Ik geef toe, dat het absolute bewijs voorloopig niet is geleverd; immers, zooals reeds is opgemerkt, de leucopenie, die we als gevolg van de injectie vinden, is zonder twijfel veroorzaakt door plaatselijke ophooping van bloedelementen, en wel in de buicapillairen, maar in hoeverre al die cellen emigreeren, leert het bloedonderzoek niet; er bestaat een mogelijkheid, dat de lymphocyten alleen wandstandig gaan staan, zonder de bloedbaan te verlaten. Ook weten we niet, welk deel van het exsudaat direct verband houdt met de daling van het aantal leucocyten in het bloed, en welk deel afkomstig is van leucocyten, nieuw aangemaakt in de

bloedregeneratieorganen. Wil men de gewone kleine lymphocyten de mogelijkheid tot emigratie ontzeggen, dan zou men het reusachtige aantal neutrophielen in het exsudaat alleen kunnen verklaren als afkomstig van pas nieuwgevormde neutrophielen, die de bloedbaan vanaf het beenmerg tot het exsudaat alleen als passage gebruiken. Behalve dat evenwel de emigratiemogelijkheid voor mononucleaire cellen juist voor het konijn met zekerheid is vastgesteld (SCHWARZ), wordt men dan voor de moeilijkheid geplaatst, hoe het mogelijk is, dat dan een dier als het konijn een constant aantal bloedlymphocyten behoudt, zonder dat het tot ophooping komt, als deze niet kunnen emigreeren. Zegt men, dat de lymphocyten wel de bloedbaan kunnen verlaten, dan zou men ze m.i. ook in het exsudaat moeten vinden in een aantal en een vorm, welke eenigszins met de verhoudingen in het bloed overeenstemt; immers het is al zeer gekunsteld, aan te nemen, dat ze wel emigreeren, maar in het weefsel blijven steken, en door de polynucleaire cellen worden gepasseerd. Neemt men eenmaal aan, dat de cellen op grond van een prikkel een gerichte beweging krijgen, dan kan men zich die beweging ook moeilijk anders denken, dan voortgezet tot de plaats van het exsudaat. Bovendien kon ik in het mesenterium van een reusachtige ophooping van lymphocyten niets vinden, wel van polynucleairen.

De voor de hand liggende verklaring is m.i., dat bij het konijn de bloedleucocyten nog voor het grootste deel het uiterlijke kenmerk dragen van de lymphocyten, maar kort vóór of nadat ze de bloedbaan verlaten hebben, zich omvormen tot polynucleaire cellen, waardoor het paradoxaal lijkende verschijnsel mogelijk wordt, dat een dier, waarvan de bloedleucocyten grotendeels lymphoid zijn, toch een uitsluitend polynucleair exsudaat geeft, terwijl de vorming hiervan gepaard gaat met een daling der

lymphocyten in het bloed. Waar de overgang plaats heeft, in of buiten het bloed, kan voorloopig buiten beschouwing blijven; naar ik hoop, zal een nauwkeurig plaatselijk onderzoek hier een nader licht kunnen brengen.

Zulk een overgang van lymphocyten in polynucleaire cellen in of in de onmiddellijke nabijheid van het bloed, is niet in overeenstemming met de tegenwoordig gangbare opvatting; zelfs de unitariers, voor wie die overgangsmogelijkheid de grondslag is van hun eenheidsleer, schrikken voor zulk een overgang in de bloedbaan terug. Toch is de mogelijkheid hiervan reeds door GRAWITZ geopperd, en o.a. door NEUMANN ¹⁾ voor amphibien met zekerheid vastgesteld; voor de hogere dieren acht zelfs WEIDENREICH ²⁾ het niet waarschijnlijk, dat deze overgang in het bloed van groote beteekenis kan zijn, omdat men zoo weinig van overgangsvormen bespeurt. Verplaatst men evenwel die overgang naar plaatsen, waar door capillair-attractie lymphocyten zijn opgehoopt, dan is het niet zichtbaar zijn van de overgang niet verwonderlijk. In den laatsten tijd schijnt het trouwens werkelijk A. MAXIMOFF ³⁾ gelukt door cultuur in vitro met behulp van beenmergextract den overgang van lymphocyten in gegranuleerde cellen aan te toonen.

Nemen we deze emigratiemogelijkheid aan voor cellen, die als lymphocyten in het bloed voorkomen, dan moet dit ons juist versterken in het geloof, dat ten minste de groote meerderheid van de mononucleaire cellen in het exsudaat plaatselijk ontstaan, nog afgezien van de vroeger daarvoor genoemde gronden. Immers waren deze cellen uit het bloed afkomstig,

¹⁾ Virch. Arch. **174**, p. 41.

²⁾ l. c.

³⁾ C. R. d. l. S. d. B., 1917, T. **79**, p. 222, 225, 235.

dan is het onbegrijpelijk, waarom ze niet boven de neutrophiele cellen in aantal blijven overwegen, zooals in de eerste uren na een eerste injectie werkelijk het geval is, en verder, waarom bij een herhaalde injectie het aanvankelijk overwegen van de mononucleaire cellen ontbreekt.

Op grond van alle verschijnselen, die ik aan leucocyten zelf heb waargenomen, vergeleken met die in de litteratuur vermeld, lijkt me dus het eenheidsstandpunt verre verkieselijk boven het dualisme. Het zou me te ver voeren, hier in het korte bestek van dit overzicht de moeilijkheden en tegenstrijdigheden op te noemen, waarvoor het dualisme ons stelt, hoe aanlokkelijk deze theorie ook vooral van klinisch standpunt mag schijnen. Naast de eenheid in afkomst en bestemming zou ik evenwel het antagonisme in functie op den voorgrond willen stellen, maar nu niet zoo zeer tusschen cellen van verschillend voorkomen als wel op grond van de plaats, waar ze zich bevinden; de functioneele verschillen, wat betreft oxydasereactie, granulaties, glycogeen-gehalte enz. kunnen m.i. gerust in het licht gesteld worden.

Ik zou dit proefschrift willen besluiten, met in 't kort de voorstelling weer te geven, zooals ik ze mij van het leucocytenbestaan heb gevormd, al is ook deze voorstelling nog betrekkelijk vaag en vertoont ze menige lacune.

Het leucocytenleven verloopt dan volgens mijne opvatting in een kringloop, welke zich afspeelt tusschen bloed en weefsel. In de embryonale ontwikkeling vormt zich in het weefsel (mesenchym) het bloed, en vanaf dit oogenblik ontstaat een antagonisme tusschen deze twee. Stamvorm van alle bloed- en weefselelementen is de neutrale mesenchymcel, die nog een groot aantal ontwikkelingsmogelijkheden in zich bergt. Onder verschillende omstandigheden, welke ligt nog geheel in het duister, kunnen die ontwikkelingsmogelijkheden zich manifesteren in kenmerken der

cel, in andere omstandigheden blijven zij langer latent. Die ontwikkeling zal in hoofdzaak afhankelijk zijn van de omgeving der cellen, en als twee fundamenteel verschillende milieu's fungeeren nu het bloed eenerzijds en het weefsel (lymphe) anderzijds. Vanaf de eerste scheiding gaat het leven in deze twee antagonistisch, als gevolg van de verschillende samenstelling der middenstof; hierdoor zullen de cellen, die in het bindweefsel het lymphoïde type vertoonen, in het bloed zich in andere richting gaan ontwikkelen, welke ontwikkeling na korten of langen tijd zich kan uiten in het optreden van granulatie, en waardoor de levensuitingen dezer cellen in zekeren zin tegengesteld zijn aan die in het bindweefsel. Bloed en weefsel zouden eenigermate te vergelijken zijn met de polen van een element, dat gesloten is, en op die wijze een kringloop onderhoudt, maar zich voortdurend weer oplaadt door de niet gelijk gerichte werkzaamheid der cellige elementen. Het verschil, eenmaal in het leven geroepen, moet nu automatisch zich zelf in stand houden. De beide gescheiden polen, om bij dit beeld te blijven, al hebben ze een eigen leven, staan toch in onafgebroken wisselwerking; hiervan is de uitwisseling van bestanddeelen tusschen beide het gevolg en een daarvan is de kringloop der leucocyten; het is werkelijk aanlokkelijk, met SCHWYZER (zie pag. 124 e.v.) te spreken van een potentiaalverschil, dat tusschen weefsel en bloed blijvend onderhouden wordt; daardoor heeft voortdurend uitwisseling plaats; de weefselcellen bewegen zich op de eene plaats in de richting naar de bloedbaan (lymphestroom, eventueel ook immigratie direct uit de lymphklieren); in het bloed gekomen zullen ze echter onveranderlijk den invloed van het veranderde milieu ondergaan; hun levensprocessen richten zich naar het milieu, worden dus tot op zekere hoogte antagonistisch aan hun voorafgaand bestaan; na korteren of langeren tijd zal zich dit

kunnen uiten in een andere habitus van de cel, d. w. z. de polynucleaire gegranuleerde cel ontstaat. Maar ook al draagt de cel nog niet de uiterlijke kenteekenen van gegranuleerde cel, zoo zal hij ook als z.n. lymphocyt in het bloed al spoedig iets anders zijn dan de lymphoïde cel in het weefsel. Alle cellen, eenmaal in het bloed, veranderen zóódanig, dat ze weer een bewegingstendenz krijgen in de richting van het weefsel. Op deze wijze is een blijvende ophooping der cellen in een van de beide weefsels onmogelijk; onderstellen we b.v., dat het aantal cellen in het bloed te groot wordt, automatisch vergroot daardoor het antagonisme en versterkte emigratie moet hiervan het gevolg zijn. De scheiding, eenmaal tusschen beide weefsels ontstaan, onderhoudt zich zelf in onveranderlijk evenwicht; een tijdelijke stoornis ergens in den kringloop kan normaal alleen een tijdelijke verandering te weeg brengen. Als zulk een stoornis zullen alle mogelijke plaatselijke weefselveranderingen kunnen fungeeren; in dien zin zou dan ook te beschouwen zijn de verandering, die in het weefsel ontstaat na plaatselijke injectie van allerlei stoffen in het bindweefsel; er komt eerst een verhoogd antagonisme, dat zich evenwel zelf weder opheft door plaatselijk verhoogde emigratie; zijn geen verdere invloeden aanwezig, dan houdt de prikkel spoedig op; zoolang evenwel de locale verandering zich zelf weer herstelt (locale bacterieele infectie), zal ook de emigratie doorgaan. Afzonderlijke chemotactische invloeden aan te nemen, zou bij deze onderstelling overbodig zijn; evenmin een chemotactische werking van verre op de bloedregeneratieorganen; immers het plaatselijk uittreden in massa zal het bloed, laten we zeggen, minder positief achterlaten, en zal dus op andere plaatsen weer hernieuwde toevoer automatisch veroorzaken. Een zeer bijzondere plaats zou dan hierbij het beenmerg innemen; dit weefsel is

als 't ware de bakermat van de bloedelementen, dus om zoo te zeggen, ingeschakeld in de bloedbaan; als zoodanig zullen hier de eigenschappen van het bloed in den hoogsten graad aanwezig zijn, m. a. w. hier zal de hoogste lading, als we het bloed bijv. positief geladen noemen, aanwezig zijn, en een neiging, om elementen in het bloed los te laten, welke wederom grooter zal zijn, als de lading van het bloed is gedaald.

Elke verandering op de een of andere plaats werkt dus automatisch op alle onderdeelen van het ingewikkelde systeem in, zoodanig dat steeds het evenwicht zich herstelt.

De eenmaal tot stand gekomen scheiding tusschen bloed en weefsel zal dus het leven der witte bloed- (en weefsel-)cellen in onveranderlijke banen leiden, waardoor tevens het antagonisme onderhouden wordt; de cellen komen uit milieu 1 na een zekeren tijd in milieu 2, veranderen aldaar, en hun gewijzigd leven zal het antagonisme tegenover milieu 1 mee helpen onderhouden; daardoor zullen de veranderde cellen ten slotte in milieu 1 terugkeeren.

Die terugkeer der rijpe cellen in hun oorspronkelijk milieu beduidt dan over het algemeen tevens hun ondergang. De aanhangers van de unitarische leer ¹⁾ beschouwen de polynucleaire cel als degene, die geen verdere ontwikkelingsmogelijkheid heeft, en bestemd is te degenereeren; de kernpolymorphie zou hiervan het eerste teeken zijn. Als deze celvorm in het bindweefsel terugkeert, kan zij niet meer terugkeeren tot den vorm van weefselleucocyt, dus tot het z.n. lymphoïde type, maar is in dit milieu niet meer bestaanbaar, gaat er te gronde na korteren of langeren tijd. De z.n. lymphocyten in het bloed zou men zich desnoods kunnen denken te emigreeren, om dan

¹⁾ Zie WEIDENREICH, l. c.

nog weer in hun vroegeren staat van weefselcellen terug te keeren, omdat ze nog niet de irreversibile rijping hebben ondergaan; op grond van de bovenaangehaalde proeven van FERINGA lijkt het me evenwel waarschijnlijk, dat de bloedlymphocyten voor het grootste gedeelte, alvorens te emigreeren of in elk geval vlak daarna, ook de uitwendige vorm aannemen, behoorend bij hun veranderd bestaan in het bloed.

De oorzaken, welke maken dat de leucocyt in het bloed een bepaalde ontwikkelingstendenz volgt, zouden velerlei kunnen zijn; men zou hier aan allerlei factoren kunnen denken, welke in het bloed aanwezig zijn, en het zou dan niet ééne oorzaak zijn, maar een complex van samenwerkende factoren: men zou kunnen denken aan de gelijktijdige aanwezigheid van roode bloedcellen; mijn eigen proeven over den invloed van het eiwitgehalte vestigen onwillekeurig de aandacht op dezen factor. Men kan zich denken, dat de celrijping een sneller verloop neemt, door de aanwezigheid van vele cellen in elkaars onmiddellijke nabijheid, dus b.v. door capillairattractie, zooals na injectie in de buikholte, omdat daar immers dan als 't ware in zekeren zin een kunstmatig beenmerg wordt gevormd, een grensgebied tusschen twee zeer verschillende ladingen. Daarom zou ook de ontwikkeling in het beenmerg versneld zijn.

De milt, een in de bloedbaan ingeschakelde lymphklier, neemt als 't ware een neutraal standpunt in: vandaar ook zijn tweeslachtig karakter.

Het is het groote voordeel van de unitarische leer, dat zij het leucocytenbestaan ergens laat eindigen; WEIDENREICH merkt terecht op, dat men van zuiver dualistisch standpunt geen antwoord kan geven op de vraag, waar het ontzaglijke aantal lymphocyten blijft, dat dagelijks met den lymphstroom het bloed bereikt, zonder dat het tot een opeenhooping dezer cellen in

het bloed komt. BIEDL en DECASTELLO¹⁾ berekenden het aantal lymphocyten, dat door den ductus thoracicus per dag in het bloed van den hond overgaat, op nagenoeg evenveel als het totale aantal witte bloedcellen, op een bepaald oogenblik in het bloed van den hond aanwezig.

Volgens de unitarische opvatting gaan dus voortdurend een groot aantal witte bloedlichaampjes te gronde; naar de weefsels zal ook onder normale omstandigheden emigratie voorkomen, en m.i. zal dit normale verbruik zeer belangrijk zijn, en het bestaan van de gegranuleerde leucocyten in het bloed slechts zeer kortdurend. Men denke slechts aan het zeer sterke verbruik na een zoo geringe en kortdurende prikkel als een eenvoudige insputting van NaCl 0.9. De voortdurende aanvoer maakt echter, dat dit verbruik spoorloos verloopt; alleen een plotseling sterk vermeerderd gebruik is te zien in weefsel en bloed gedurende korten tijd.

Alleen de speciaal gegranuleerde vorm is een vast, niet voor verandering vatbaar celtype; de andere kunnen zich aanpassen aan de omgeving, waar zij zich bevinden.

Dat bijv. bij den mensch en het konijn, of bij het kind en den volwassen mensch de onderlinge verhouding tusschen lymphocyten en polynucleaire cellen zoo sterk verschilt, is ook gemakkelijk te verklaren, als men aanneemt, dat, als de tegenstelling bloed-lymphe zich wijzigt, de overgang van lymphocyt in leucocyt langer of korter kan duren, als ook de tijd, gedurende welken een polynucleaire cel in het bloed blijft, alvorens te emigreeren. Dat werkelijk dergelijke constante verschillen tusschen verschillende bloedsoorten bestaan, bewijst wel RADSMA's²⁾ mededeeling, dat voor verschillende diersoorten de agglutinatie

¹⁾ PFLÜGER's Arch., **86**, 1901.

²⁾ Dissert., Groningen, 1919.

der roode bloedlichaampjes bij verschillende H-ionen-concentratie plaats vindt. Verschillen in lading en als gevolg daarvan in bezinkingssnelheid voor de roode bloedlichaampjes van verschillende dieren vermelden ook R. FÄHRAEUS ¹⁾ en KOZAWA ²⁾.

Het automatisch emigreeren op een bepaalde prikkel is in den regel tevens een groot vitaal belang, omdat de opgeroepen cellen de schadelijke werking van de anders gerichte levensprocessen der bacterien zullen kunnen neutraliseeren.

Hierbij zal zich hunne fermentwerking, een der gevolgen van de celrijping, ontplooien, hierbij zal ook de phagocytose een grootere of kleinere rol kunnen spelen; al naar den tijd, gedurende welken de leucocyt buiten de bloedbaan als cel blijft bestaan, zal intra- of extracellulaire vertering hier meer of minder op den voorgrond treden. ³⁾

Hoe belangrijk werkelijk de rol van de algemeene, maar vooral van de locale leucocytose is, wordt uit de onderzoekingen van de laatste jaren steeds duidelijker. Ik noem hier slechts de namen WEIL ⁴⁾, PETTERSON ⁵⁾ en SCHNEIDER ⁶⁾, die

¹⁾ Bioch. Zeitschr., **89**, p. 355.

²⁾ Bioch. Zeitschr., **60**, p. 146.

³⁾ Naar aanleiding van deze fermentwerking wil ik hier nog even de de aandacht vestigen op de hierover bestaande begripsverwarring. Zoo vermeldt OPPENHEIMER (Grundriss der Physiologie, I: Biochemie, p. 133) dat de *leucoprotease* alleen voorkomt in de gegranuleerde cellen van mensch, aap en hond, omdat hier de cellen alleen een zuivere neutrophiele granulatie hebben. Ter zelfder plaatse zegt hij echter, dat dit ferment zeker een rol speelt bij de vernietiging van vreemde cellen door phagocytose (bacterien, bloedlichaampjes), en vergeet daarbij, dat de hiervoor in aanmerking komende cellen zeker niet uitsluitend, misschien zelfs niet in de eerste plaats, „neutrophiele” leucocyten zijn.

⁴⁾ Arch. f. Hygiene **70**, 173—216.

⁵⁾ Zeitschr. f. Imm. Forsch. Orig. **26**, 1917, p. 305.

⁶⁾ Arch. f. Hygiene, **70**, 40—162.

alle de sterke bacteriedoodende werking van leucocyten of hunne extracten konden aantoonen; vooral lijkt me in dit verband zeer bewijzend de verminderde weerstand tegen infecties, welke LIPPMANN ¹⁾ vond bij zijn aleucocytaire dieren.

Wanneer we verder een zóó sterk te gronde gaan van cellen aannemen, als mij waarschijnlijk wil voorkomen, moeten we ook verwachten, dat de resten van deze cellysis een grooten invloed moeten uitoefenen op de samenstelling van lympe en bloed, en eveneens op de functie van de lymphklieren, die er het eerst mee in aanraking komen, en men keert weer terug tot de leer van METCHNIKOFF, dat serumeigenschappen ten slotte alleen het gevolg zijn van celprocessen; in de laatste jaren wordt op de groote beteekenis van dit te gronde gaan van cellen steeds meer de aandacht gevestigd. Ik wijs hier op de onderzoeken door en bij VON LIEBERMANN ²⁾ verricht, op grond waarvan deze zijn selectiehypothese over de immuniteit formuleerde. In andere richting kennen ook HERZFELD en KLINGER ³⁾ aan vervalproducten der cellen voor het tot stand komen van verschillende eigenschappen van het bloed een groote rol toe. Hoe groot dit verval moet zijn, daarvan leveren mijne proeven een duidelijk bewijs. Dat hierbij vooral de polynucleaire cellen een groote rol spelen, staat voor mij ontwijfelbaar vast.

De organiseerende werking der weefselcellen treedt eerst op, als de neutraliseerende invloed van de gegranuleerde cellen zijn beslag heeft gekregen, de laatste geven dus de eerste reactie, vangen den eersten stoot op, het reactieproduct op zijn

¹⁾ Z. f. Imm. Forsch., Orig., 1916, 24, p. 107.

²⁾ Zie o.a. Bioch. Zeitschr., 91, p. 46.

³⁾ Zie o.a. Bioch. Zeitschr., 85, 1—44.

beurt valt nu ten offer aan in hoofdzaak intracellulaire functies der bindweefselementen (macrophagen).

De medegedeelde beschouwingen over den levensloop der leucocyten zijn uit den aard der zaak grootendeels speculatief. Zij maken bovendien geenszins aanspraak op volledigheid; zoo zijn o.a. de eosinophile cellen geheel buiten bespreking gebleven. Met opzet heb ik mij echter bepaald tot de beide hoofdsorten: lymphocyten en neutrophiele cellen, omdat het aantal daarvan in het bloed bijna constant onderling vicarieert. In de uitgebreide litteratuur over de leucopenie (gevolgd door leucocytose), veroorzaakt door intraveneuze injectie van toxinen of indifferente stoffen, heeft men zich m. i. al te veel laten leiden door de veranderingen in het aantal gegranuleerde cellen, en de lymphocyten daarbij verwaarloosd; dit is b.v. het geval bij de klassieke onderzoekingen van WERIGO ¹⁾, waar toch de verandering in het aantal lymphocyten (hij werkte met konijnen) ook zeer opmerkelijk is. Een uitgebreid onderzoek van de verschillende soorten witte bloedlichaampjes in verschillende weefsels zal noodig zijn, om na te gaan, of constant verschillend gedrag in velerlei opzicht tusschen de cellen van bloed en weefsel bestaat. Door dergelijke proeven hoop ik bij daarvoor geschikte dieren met behulp o.a. van mijn injectiemethode nog nadere gegevens te verkrijgen omtrent de factoren, die het leven der witte bloedlichaampjes besturen.

¹⁾ PLÜGER's Archiv., 84, p. 451.

HOOFDSTUK VII.

SAMENVATTING.

In het kort samengevat, leidde mijn onderzoek tot de volgende resultaten en conclusies:

I. Er wordt een methode beschreven, door middel waarvan bij verschillende diersoorten uit de buikholte gemakkelijk en bij herhaling een groote hoeveelheid leucocyten kan worden verkregen.

II. Aangaande de PHAGOCYTOSE:

In de eerste plaats bleek de vroeger gevonden invloed van Chloroform op de phagocytose van kool in NaCl 0.9 ook in het milieu serum van kracht te zijn, zij het ook in andere concentratieverhoudingen, berustend op de binding van chloroform aan de colloïde serumstoffen.

Daarentegen bleek, dat de eveneens vroeger gevonden bevorderende werking van stoffen als Na-propionaat op de phagocytose alleen voorkomt in het milieu NaCl 0.9 en bij gebruik van kool als object van phagocytose. Zoowel door verandering van het milieu (serum of een serumverduunning), als door verandering van het object van phagocytose (amylum in plaats van kool) werd het effect van toevoeging van Na-propionaat geheel te niet gedaan. Wel gelukte het in dit opzicht amyllum de eigenschappen van kool te geven, door het vóór te behandelen met serum.

Hiertegenover bleek de werking van de toevoeging van CaCl_2 aan verschillend milieu (serumhoudend en serumvrij), bij verschillende

diersoorten en voor verschillend object van phagocytose (kool en amyllum) steeds sterk bevorderend te zijn voor de phagocytose.

Bij het onderzoeken van de mate, waarin verschillende colloïde en niet colloïde serumstoffen als factoren voor de phagocytose van amyllum van invloed zijn, bleek resp. bij „exsudaat-leucocyten” (konijn) en bij „bloedleucocyten” (paard, varken) het effect niet altijd hetzelfde. Wel werd in alle gevallen constant gevonden, dat van al de uitwendige invloeden op het phagocytoseproces de serumcolloïden een overwegende rol spelen. Van de „anorganische” factoren was de invloed van Ca-ionen, zooals gezegd, constant aantoonbaar, maar in wisselenden graad. In enkele gevallen, n.l. bij exsudaat-leucocyten in een bepaald stadium, kon in colloïd-vrij milieu door Ca-toevoeging een nagenoeg maximale phagocytose worden verkregen. Hier leek de Ca-invloed tot op zekere hoogte evenredig met de vitaliteit der exsudaat-leucocyten. Bij direct uit het bloed afkomstige leucocyten (paard) was echter de Ca-werking steeds veel minder duidelijk. Het sterkst kwam zij tot uiting in hypisotonisch milieu.

Groot bleek de invloed van het aantal H-ionen in de vloeistof, vooral als de vloeistof colloïden bevatte; in dit laatste geval was het optimum voor phagocytose duidelijk meer naar den alkalischen kant verschoven dan in colloïdvrij milieu.

Van andere ionen (K , HCO_3) was geen duidelijke invloed op de phagocytose merkbaar.

De totale invloed van al de niet colloïde factoren werd aan ultrafiltraat bestudeerd; hier bleek de groote afhankelijkheid van de phagocytose van het aantal H-ionen, waarvan de schommeling werd verkregen door wisselende CO_2 -spanning. Bij gunstige concentratieverhoudingen der H-ionen, overeenkomende met een nagenoeg neutrale reactie, bleek in ultrafiltraat in vele gevallen een aanmerkelijke phagocytose mogelijk, echter steeds duidelijk lager, dan door toevoeging van serum aan een minder physiologisch milieu ($NaCl$ 0.9) kan worden verkregen; soms ook was de gunstige invloed van het ultrafiltraat, vergeleken met $NaCl$ 0.9, slechts onbeduidend (paard).

Over het algemeen bleek de phagocytose zeer grillig, zonder vaste regels, te verlopen; dit is in overeenstemming met de voorstelling, die RHUMBLER geeft van de voorwaarden, waaronder phagocytose tot stand kan komen; de zeer ingewikkelde verhoudingen, welke hierbij van invloed kunnen zijn, maken, dat een invloed op de phagocytose in vele gevallen als het ware buiten de phagocyteerende cel zelf omgaat, en in geen geval mag worden beschouwd als een maatstaf voor den toestand, waarin de cel verkeert.

Van het laatste is alleen tot op zekere hoogte sprake, als we de phagocytose nagaan in een standaard-milieu, waarin normale leucocyten constant phagocyteeren; dit is het geval voor de phagocytose van amylum in verdunningen van serum met NaCl 0.9 van niet te geringe concentratie; in dit milieu phagocyteerden levende leucocyten van verschillende dieren constant zeer sterk; uitblijven der phagocytose in dit milieu, zooals bv. na behandeling met sterk verdunde sublimaatoplossingen, is bewijzend voor het afsterven der leucocyten. Op deze wijze kon ik aantoonen, dat leucocyten in verschillend milieu verschillend snel afsterven. Aan den anderen kant bleek niet onder alle omstandigheden bij gestorven, of in elk geval afstervende leucocyten alle phagocytose verdwenen; o.a. na chloroformbehandeling bleek het vermogen tot phagocytose onverminderd aanwezig, terwijl toch op grond van andere verschijnselen de leucocyten op zijn minst genomen op den rand van afsterven stonden. De cel schijnt dus somtijds in een bepaalde phase van het afstervingsproces zijn vermogen tot phagocytose te behouden, wat op grond van de opvatting, dat de phagocytose is een resultante van krachten, ook te verwachten is.

III. Wat betreft de AMOEBOIDE BEWEGELIJKHEID:

De amoeboid bewegelijkheid werd onderzocht in verschillende vloeistoffen, door de op een zeker oogenblik aanwezige uitloopers momentaan te fixeeren met osmiumzuur, en dan microscopisch te onderzoeken. Op deze wijze komt het vermogen der cel, zijn vorm

te veranderen, zuiverder tot uitdrukking, dan door bijv. de voortbeweging over een onderlaag na te gaan.

Het vermogen, pseudopodien uit te zenden, bleek met de phagocytose geen verband te houden; in vele gevallen gingen beide absoluut niet samen.

Wel bestond die samenhang, voor zoover betreft de invloed van de temperatuur. Zoowel het vormen van pseudopodien als de phagocytose waren eerst mogelijk van af een temperatuur van 16° C. naar boven; vanaf een temperatuur van 25° C. was geen duidelijke versterking meer merkbaar.

De amoeboïde bewegelijkheid wordt niet merkbaar beïnvloed door het object van phagocytose, maar wel zeer sterk door het milieu, evenwel meestal in anderen zin dan de phagocytose.

Zeer sterk bevorderlijk voor de pseudopodienvorming bleek de aanwezigheid van colloïden in het milieu; hierbij is geen sprake van een specifieke werking van serumcolloïden, daar bijv. een oplossing van gummi arabicum hetzelfde effect heeft. Ook in oplossingen, vrij van colloïden, is echter onder bepaalde omstandigheden sterke pseudopodienvorming mogelijk, het duidelijkst in ultrafiltraat. In tegenstelling met hetgeen we voor de phagocytose zagen, spelen hierbij de Ca-ionen geen duidelijke rol, wel daarentegen de HCO_3^- -ionen. Van zeer veel gewicht is steeds een bepaalde concentratie der H-ionen in het milieu; deze kan evenwel in een colloïdhoudende vloeistof lager zijn dan bij afwezigheid van colloïden; een iets te groot aantal H-ionen heft echter steeds de amoeboïde beweging op.

Omtrent de gerichte amoeboïde bewegelijkheid, die we emigratie noemen, leerden mijne proeven, dat alle, ook physiologische vloeistoffen, in de buikholte gebracht, in ongeveer dezelfde intensiteit emigratie bewerken. Het komt mij waarschijnlijk voor, dat hier een potentiaalverschil met het bloed van groote beteekenis is.

IV. Wat betreft de STOFWISSELINGSVERSCHEIJNSELEN in de witte bloedlichaampjes, bleek het volgende:

a. *Er wordt eene micro-methode beschreven, waarmee het glycogeengehalte in kleine hoeveelheden leucocyten kan worden bepaald.*

b. *Het glycogeengehalte staat duidelijk onder invloed van het milieu. In verschillende milieu's (ultrafiltraat, NaCl 0.9, verdund serum) vermindert in vitro het glycogeengehalte, grootendeels tengevolge van cytolyse; verschillende invloeden, welke cytolyse tegengaan (verhoogde zuurgraad, Na-citraat) houden tot op zekere hoogte de vermindering van het glycogeen tegen. Afgezien van deze cytolyse wordt het glycogeen zeer moeilijk aan de cel in levenden, zoowel als in gefixeerden toestand, onttrokken.*

Onder den invloed van bloedserum verandert zeer zeker het glycogeengehalte, en oogenschijnlijk door inwendige celprocessen, in elk geval niet onder invloed van cytolysis. Deze verandering onder invloed van serum is kwalitatief en quantitatief niet altijd dezelfde.

Ten slotte lijkt het meer dan waarschijnlijk, dat het glycogeen onder normale omstandigheid reeds in de leucocyten in het bloed aanwezig is en niet eerst onder den invloed van het emigreeren wordt gevormd. De microscopische jodiumreactie in exsudaat-leucocyten, die bekend staat als „jodophilie,” kan daardoor worden verklaard, dat in het bloed het glycogeen zoodanig is vastgelegd, dat het met jodium niet reageert, in de geemigreerde leucocyten daarentegen manifest wordt. Er is voorloopig geen reden om er aan te twijfelen, dat de jodophilie der leucocyten werkelijk op de aanwezigheid van glycogeen berust. Zij is evenwel voor zooveel uitleggingen vatbaar, dat zij nooit kan gebruikt worden als maatstaf voor het glycogeengehalte der cellen. Het ontbreken van de jodophilie in de mononucleaire weefselcellen maakt het mogelijk, in het exsudaat direct de geemigreerde en de weefselementen te onderscheiden.

Het verband tusschen glycogeenvermeerdering (of liever het manifest worden er van door middel van de jodiumreactie) en celdegeneratie is voorloopig niet uitgemaakt. Wel schijnt het glycogeenproces zich

in de cel af te spelen, niet beïnvloed door het koolhydraatgehalte van de omgevende vloeistof.

c. Ook reductiewerkingen in de leucocyten bleken zeer duidelijk beïnvloed te worden door het milieu. In ultrafiltraat, dat ook de pseudopodienvorming begunstigde, was deze reductiewerking zeer sterk. Dit pleit voor de opvatting, dat de pseudopodienvorming beheerscht wordt door intracellulaire stofwisselingsprocessen onder invloed van de omgeving.

V. Wat betreft den LEVENSDUUR der witte bloedlichaampjes in verschillend milieu, bleek, dat buiten het lichaam de serumcolloïden een duidelijk conserveerende werking uitoefenen, welke niet op dezelfde wijze onder invloed van andere colloïden wordt gevonden. Uit proeven in vivo bleek verder, dat de gegranuleerde cellen buiten hun natuurlijke milieu, het bloed, in de buikholte slechts zeer korten tijd kunnen blijven bestaan. Ze ondergaan daarbij dezelfde veranderingen, die we buiten het lichaam snel in NaCl 0.9 en andere vloeistoffen zagen optreden. Ze zijn niet meer in staat, opgenomen stoffen (amylum en vet) verder te veranderen. Dit laatste vermogen hebben, ten minste voor zoover het vet betreft, wel de normale weefselcellen, welke de celresten der gegranuleerde cellen in zich opnemen, en welke buiten het bloed hun normaal milieu vinden. De degeneratie der gegranuleerde cellen kan blijkens phagocytoseproeven onder den invloed van onverdund bloedserum bij 37° C. teruggaan.

VI. Ten slotte wordt de meening uitgesproken, dat ook normaal in het bloed de lymphocyten in gegranuleerde cellen kunnen overgaan, en in overeenstemming daarmee een schema omtrent den kringloop der leucocyten ontworpen; hierbij wordt de onderstelling uitgesproken, dat ook normaal een sterke emigratie van gegranuleerde cellen uit het bloed moet plaats vinden, welke de voortdurende toename van het aantal door toestroomen van nieuwe cellen compenseert.

TOELICHTING BIJ DE MICROPHOTOGRAPHIEËN.

Alle photo's hebben betrekking op leucocyten (en roode bloed-lichaampjes) van paardenbloed. De overeenkomstige zijn steeds aan één en dezelfde proef ontleend. Het amyllum is, voor zoover aanwezig, met Jodium gekleurd.

Plaat 1. Invloed van toevoeging van CaCl_2 aan het milieu op de phagocytose. Onder den invloed van de geringe hoeveelheid serum geringe pseudopodienvorming.

Vergrooting: Zeiss, Oc. 2, Obj. E.

- A. Phagocytose van amyllum in NaCl 0.9 + serum 2 $\frac{0}{10}$. Phagocytose na 30 min.: 3.5 $\frac{0}{10}$.
- B. Phagocytose van amyllum in NaCl 0.9 + serum 2 $\frac{0}{10}$ + CaCl_2 0.05. Phagocytose na 30 min.: 38 $\frac{0}{10}$.

Plaat 2. Invloed van het inactiveren van serum op phagocytose en pseudopodienvorming.

Vergrooting: Zeiss, Oc. 2, Obj. D.

- A. Phagocytose van amyllum in NaCl 0.9 + serum 5 $\frac{0}{10}$ (normaal). Phagocytose in 10 min. 42 $\frac{0}{10}$.
- B. Phagocytose van amyllum in NaCl 0.9 + serum 5 $\frac{0}{10}$ (geïnactiveerd). Phagocytose in 10 min. 0 $\frac{0}{10}$.

Plaat 3 en 4. Pseudopodienvorming en phagocytose van amyllum onder invloed van serumcolloïden.

Plaat 3: vergrooting: Zeiss, Oc. 2, Obj. D.

Plaat 4: vergrooting: Zeiss, Oc. 2, Obj. F.

- A. Milieu: NaCl 0.9. Na 10 minuten geringe phagocytose, nagenoeg geen pseudopodienvorming.
- B. Milieu: NaCl 0.9 + serum 6 $\frac{0}{10}$. Sterke phagocytose, en sterke pseudopodienvorming.

Plaat 5. Invloed van NaCl 0.9 en van ultrafiltraat op de pseudopodienvorming.

- A. Paardenleucocyten in NaCl 0.9: Geen pseudopodien.
- B. Paardenleucocyten in ultrafiltraat: sterke pseudopodienvorming.

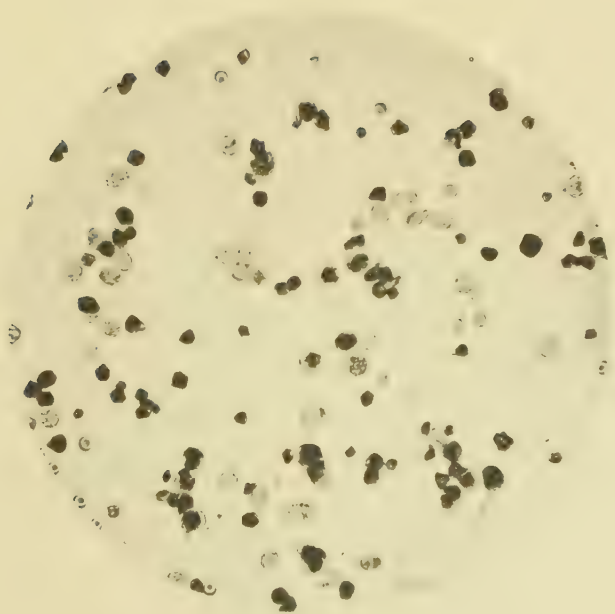
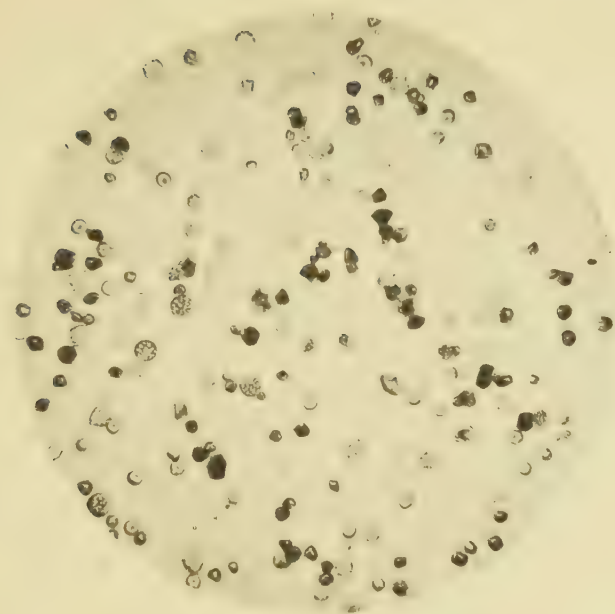
PLAAT 1.

A

I

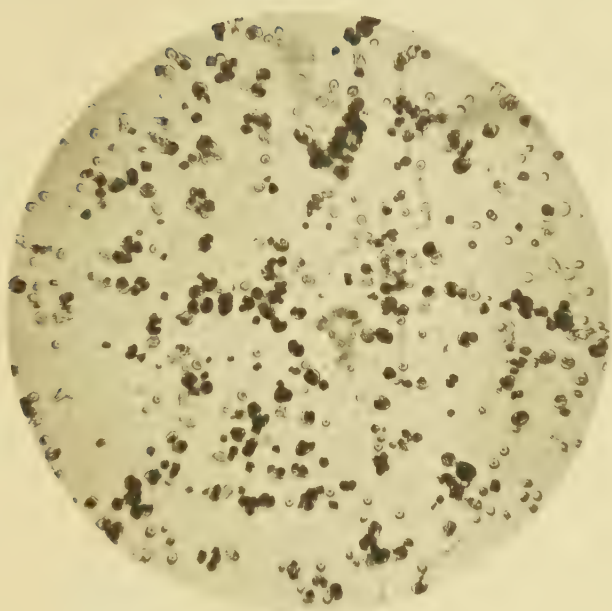
B

II



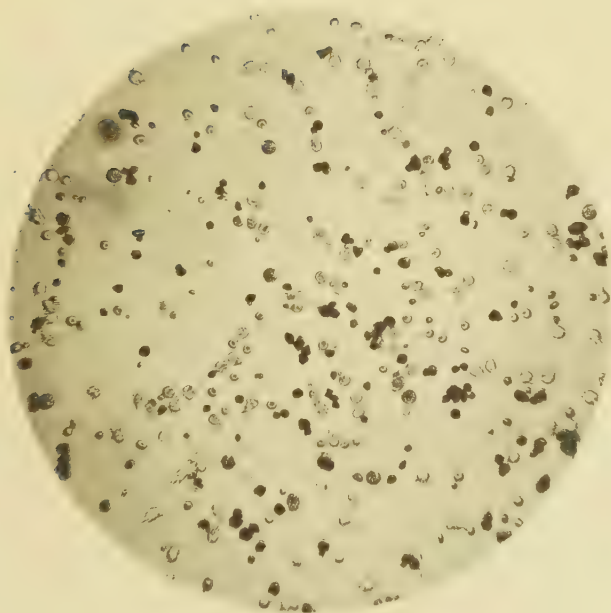
PLAAT 2.

A



III

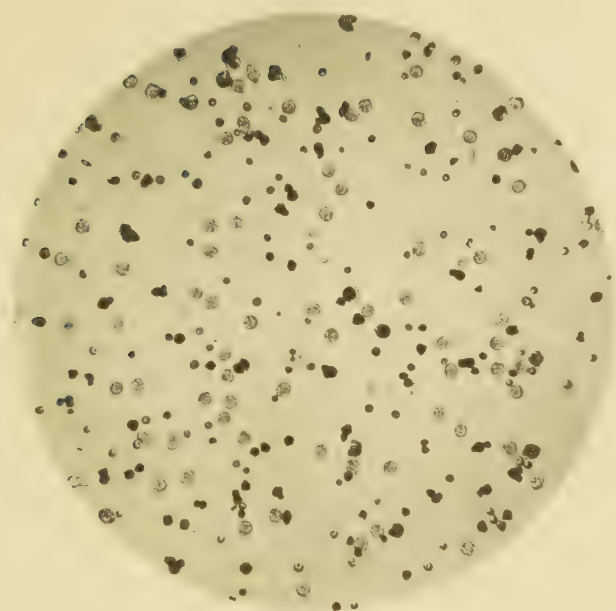
B



IV

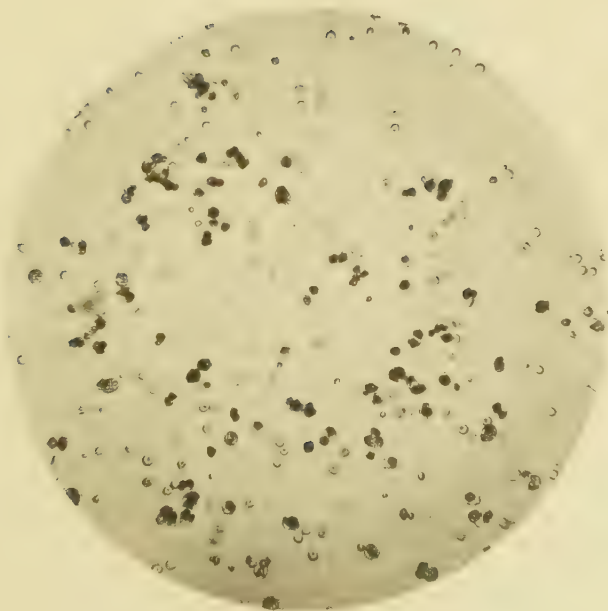
PLAAT 3.

A



V

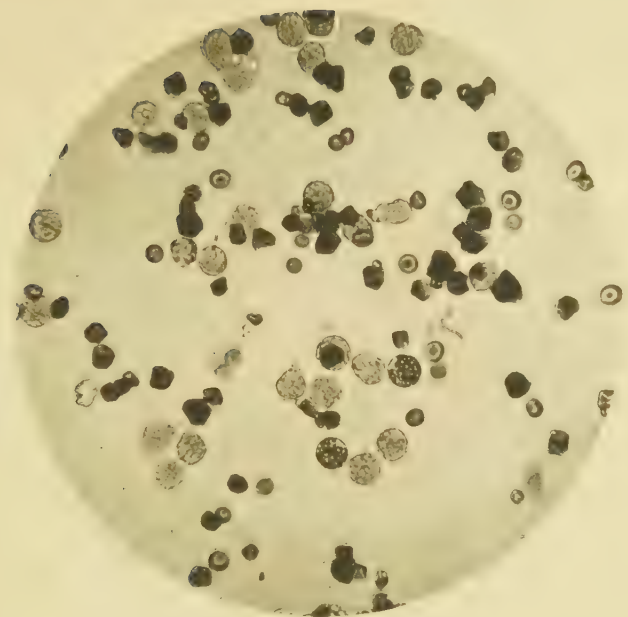
B



VI

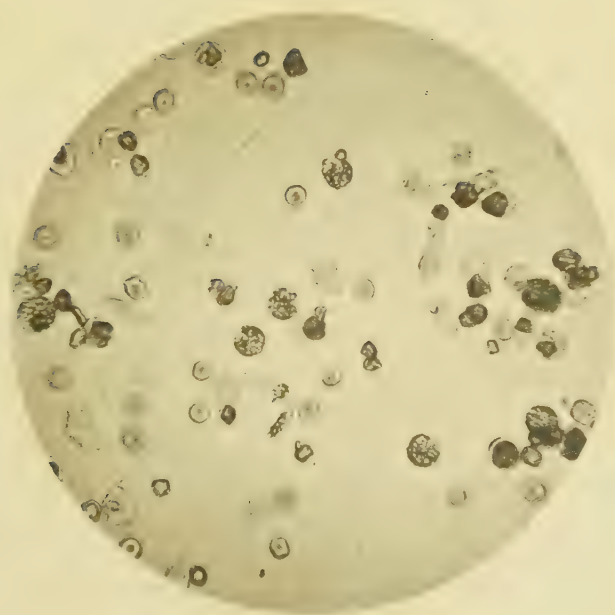
PLAAT 4.

A



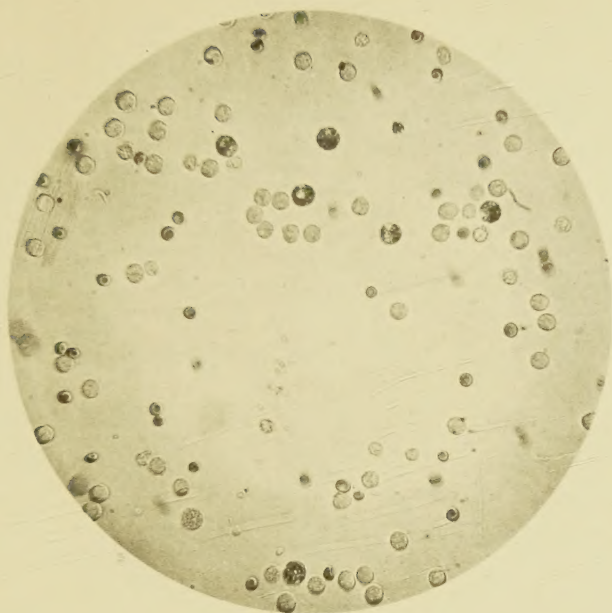
VII

B



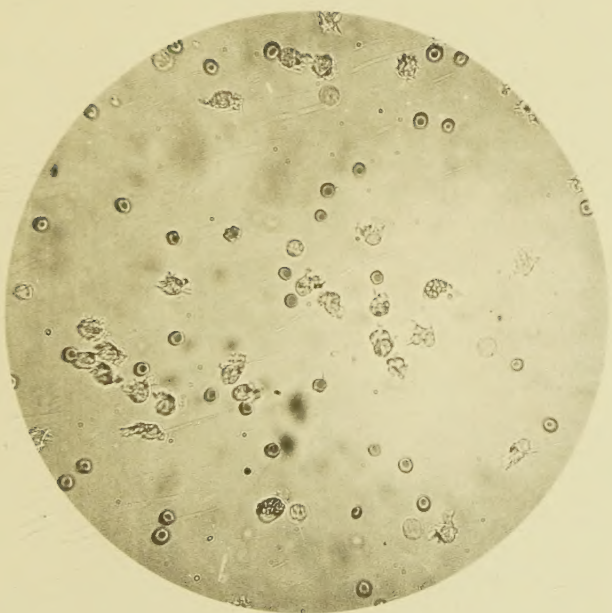
VIII

A



IX

B



X

